



⑬ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

⑯ EP 0 546 073 B1

⑩ DE 691 27 627 T 2

⑮ Int. Cl.<sup>8</sup>:  
**C 12 N 15/13**  
C 12 N 15/00  
A 01 K 67/027  
C 12 P 21/08  
C 12 N 5/10  
C 12 N 5/20

DE 691 27 627 T 2

⑲ Deutsches Aktenzeichen:	691 27 627.7
⑳ PCT-Aktenzeichen:	PCT/US91/06185
㉑ Europäisches Aktenzeichen:	91 916 470.7
㉒ PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 92/03918
㉓ PCT-Anmeldetag:	28. 8. 91
㉔ Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	19. 3. 92
㉕ Erstveröffentlichung durch das EPA:	16. 6. 93
㉖ Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	10. 9. 97
㉗ Veröffentlichungstag im Patentblatt:	19. 2. 98

⑳ Unionspriorität:

574748	29.08.90	US
575962	31.08.90	US

㉑ Patentinhaber:

Genpharm International Inc., Mountain View, Calif.,  
US

㉒ Vertreter:

Dr. Volker Vossius, Patentanwalt, Corinna Vossius,  
Rechtsanwältin, Tilman Vossius, Rechtsanwalt,  
81679 München

㉓ Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL,  
SE

㉔ Erfinder:

LONBERG, Nils, San Francisco, CA 94111, US; KAY, ..  
Robert, M., San Francisco, CA 94111, US

㉕ Produktion und Nutzung nicht-menschliche transgene Tiere zur Produktion heterologe Antikörper

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

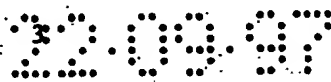
Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 691 27 627 T 2

Die gegenwärtigen Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper schließen ein das Immunisieren eines Tieres (gewöhnlich einer Ratte oder einer Maus) mit einem Antigen. Die Immunisierung (mit dem Antigen) führt zu der Bildung von Milz-B-Zellen, die Immunglobulinmoleküle mit hoher Affinität für das Antigen sezernieren. Milzzellen aus einem immunisierten Tier werden dann mit Myelomzellen fusioniert, um unsterbliche Antikörper-sezernierende Hybridomzellen zu bilden. Einzelne Hybridoma-Klone werden gescreent zur Identifizierung jener Zellen, die Immunglobuline herstellen, die gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet sind.

10 Gentechnologische Verfahren für einzelne Antikörpergene sind vorgeschlagen worden. Zwei Ansätze für gentechnologische Verfahren sind beschrieben: chimäre Antikörper und Übertragung der Komplementaritäts-bestimmenden Region (CDR). Der einfachste Ansatz, chimäre Antikörper, profitiert von der Tatsache, daß variable und konstante Regionen eines Antikörpermoleküls auf getrennten Exons codiert werden. Durch einfaches Fusionieren der variablen  
15 Region Exons eines rearrangierten (umgelagerten) Maus-Antikörper-Gens mit Exons der humanen konstanten Region kann ein Hybrid-Antikörper-Gen erhalten werden (Morrison, S.L., et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855). Das Hauptproblem bei diesem Ansatz besteht darin, daß zwar die hochimmunogene Maus Fc-Region eliminiert wird, aber die verbleibenden Maus Fab-Sequenzen weiterhin immunogen sind (Bruggemann, et al.,  
20 1989, J. Exp. Med., 170, 2153-2157). Der CDR-Übertragungsansatz verwendet Computer-Modelling zum Herstellen eines vollständig künstlichen Antikörpers, in dem die einzigen Maussequenzen diejenigen sind, die bei der Antigenbindung beteiligt sind (Riechmann, L., et al., 1988, Nature, 332, 323-327). Jeder dieser Ansätze erfordert die vorherige Charakterisierung eines Nager-monoklonalen Antikörpers, gerichtet gegen das interessierende Antigen und  
25 beide erfordern die Herstellung einer stabil transfizierten Zelllinie, die große Mengen an gentechnisch hergestelltem Antikörper produziert.

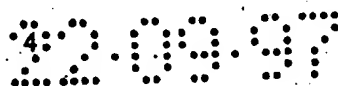
Ein weiterer Ansatz zur Herstellung von menschlichen Antikörpern ist ein Vorschlag, der die Herstellung bakterieller Expressionsbibliotheken mit Immunglobulin cDNA-Sequenzen, einschließt (Orlandi, et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833-3837, und Huse, et al.,  
30 1989, Science, 246, 1275-1281). Dieses Verfahren ist anscheinend nur zur Herstellung von Antikörperfragmenten, die sich von Maus cDNA-Sequenzen ableiten, verwendet worden.



In einer Anzahl von Experimenten ist die Verwendung von transfizierten Zelllinien berichtet worden, um die spezifischen DNA-Sequenzen zu bestimmen, die zum Ig-Gen-Rearrangement benötigt werden (vgl. Lewis und Gellert, 1989, Cell, 59, 585-588). In solchen Berichten sind mutmaßliche Sequenzen identifiziert worden, und es wurde gefolgert, daß die Zugänglichkeit dieser Sequenzen für Rekombinase-Enzyme, die zum Rearrangement verwendet wurden, moduliert wird durch die Transkription (Yancopoulos und Alt, 1985, Cell, 40, 271-281). Berichten zufolge sind die Sequenzen für V(D)J Verbindung stark konserviert, ein nahezu palindromisches Heptamer und ein weniger gut konserviertes AT-reiches Nanomer, getrennt durch einen Abstandshalter (Spacer) von entweder 12 oder 23 bp (Tonegawa, 1983, Nature, 302, 575-581; Hesse et al., 1989, Genes in Dev., 3, 1053-1061). Berichten zufolge geschieht wirkungsvolle Rekombination nur zwischen Stellen, die die Rekombinationssignalsequenzen mit unterschiedlich langen Abstandshalterregionen enthalten.

Die Herstellung transgener Mäuse mit verschiedenen Arten von Immunglobulinen ist ebenfalls berichtet worden. Rearrangierte Maus-Immunglobulin schwere oder leichte Ketten Gene sind verwendet worden zum Herstellen transgener Mäuse. Berichten zufolge sind solche Transgene in der Lage, das Rearrangement endogener Ig-Gene auszuschließen; beispielsweise in Weaver et al., 1985, Cell, 42, 117-127; Iglesias, et al., 1987, Nature, 330, 482-484; Storb et al., 1985, Banbury Reports, 20, 197-207; Neuberger et al., 1989, Nature, 338, 350-352; Hagman et al., 1989, J. Exp. Med., 169, 1911-1929, und Storb, 1989, in Immunglobulin Genes, Academic Press, T. Honjo, F.W. Alt und T.H. Rabbitts, Herausgeber, Seiten 303-326. Weiterhin sind funktionelle rearrangierte human Ig-Gene einschließlich der  $\mu$  oder  $\gamma 1$  konstanten Region in transgenen Mäusen exprimiert worden; vgl. Yamamura et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2152-2156; Nussenzweig et al., 1987, Science, 236, 816-819. Im Fall des  $\mu$  rearrangierte schwere Kette-Gens wurde der allelische Ausschluß der endogenen Immunglobulin Loci berichtet.

Allelischer Ausschluß geschieht jedoch nicht immer in allen transgenen B-Zellen; vgl. Rath et al., 1989, J. Immunol., 143, 2074-2080 (rearrangiertes  $\mu$  Genkonstrukt); Manz et al., 1988, J. Exp. Med., 168, 1363-1381 ( $\mu$  Transgene, denen Transmembran-Exons fehlen, verhindern nicht das Rearrangement endogener Gene); Ritchie et al., 1984, Nature, 312, 517-520 und



Storb et al., 1986, *Immunol. Rev.*, 89, 85-102 (transgene Mäuse, die rearrangiertes  $\kappa$  Transgen exprimieren und in der Lage sind, stabile schwere/leichte Kettenkomplexe zu bilden, rearrangieren nur endogene  $\kappa$  Gene in B-Zellen, die nicht in der Lage sind, korrekt endogenes schwere Kette-Gen zu rearrangieren); und Manz et al., 1988, *J. Exp. Med.*, 168, 1363-1381 (transgene Mäuse mit  $\kappa$  Gen, das die leichte Kette codiert und nicht in der Lage, mit schweren Ketten zu kombinieren, zeigen nur ein geringes Maß an allelischem Ausschluß); vgl. ebenfalls Nussenzweig et al., 1988, *Nature*, 336, 446-450, Durdik et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2346-2350 und Shimizu et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 8020-8023.

Somatische Mutation ist ebenfalls berichtet worden in einem 15 kb Maus  $\kappa$  Genkonstrukt in hyperimmunisierten transgenen Mäusen (O'Brien et al., 1987, *Nature*, 326, 405-409, Storb, 1989, in *Immunoglobulin Genes*, Academic Press, T. Honjo, F.W. Alt, und T.H. Rabbitts, Herausgeber, Seiten 303-326) und im variablen Teil eines  $\mu$  schwere Kette Transgens (Durdik et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2346-2350).

Ig-Gen-Rearrangement (Gen-Umlagerung) ist, obwohl in Gewebekulturzellen untersucht, in transgenen Mäusen nicht umfänglich untersucht worden. Nur einige Berichte sind veröffentlicht worden, die Rearrangement-Versuchskonstrukte in Mäuse eingebracht, beschreiben (Buchini et al., 1987, *Nature*, 326, 409-411 (nicht-rearrangiertes Hühner  $\lambda$  Transgen); Goodhart et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 4229-4233 (nicht-rearrangiertes Kaninchen  $\kappa$  Gen) und Bruggemann et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6709-6713 (Hybrid-Maus-human schwere Kette). Die Ergebnisse solcher Experimente variierten jedoch. In einigen Fällen sind unvollständige oder minimale Rearrangements des Transgens hergestellt worden.

Aufgrund des Vorhergehenden ist es klar, daß ein Bedarf an heterologen monoklonalen Antikörpern besteht, z.B. Antikörpern menschlichen Ursprungs, abgeleitet von einer anderen als der menschlichen Art. So besteht eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, eine Quelle für monoklonale Antikörper bereitzustellen, die therapeutisch in bestimmten Arten verwendet werden kann, für die sie bestimmt sind.



In Übereinstimmung mit der vorstehenden Aufgabe können transgene nicht-humane Tiere hergestellt werden, die in der Lage sind, einen heterologen Antikörper herzustellen, wie einen menschlichen Antikörper.

5 Weiterhin besteht eine Aufgabe darin, B-Zellen solcher transgener Tiere bereitzustellen, die zur Expression heterologer Antikörper in der Lage sind, wobei solche B-Zellen immortalisiert werden zur Bereitstellung einer Quelle eines spezifischen monoklonalen Antikörpers für ein bestimmtes Antigen.

10 In Übereinstimmung mit der vorstehenden Aufgabe ist eine weitere Aufgabe der Erfindung, Hybridomazellen bereitzustellen, die in der Lage sind, solche heterologen monoklonalen Antikörper zu erzeugen.

15 Heterologe, nicht-arrangierte und rearrangierte Immunglobulin schwere und leichte Ketten-Transgene werden hier beschrieben (die verwendet werden können zum Herstellen der vorher erwähnten non-humanen transgenen Tiere) ebenso, wie Verfahren zum Zerstören der endogenen Immunglobulin Loci in den transgenen Tieren.

20 Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Verfahren zum Induzieren der heterologen Antikörperproduktion in dem vorher erwähnten transgenen non-humanen Tier bereitzustellen.

Erfindungsgemäße Verfahren werden beschrieben zum Herstellen eines Immunglobulin variable Region Gensegment-Repertoires, das verwendet werden kann zum Herstellen eines oder mehrerer erfindungsgemäßer Transgene.

25 Die hier besprochenen Literaturstellen werden aufgrund ihres Offenbarungsgehaltes hier zitiert.

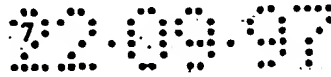
30 Es wird darauf hingewiesen, daß jeder Teil der vorliegenden Anmeldung, der nicht in Übereinstimmung ist mit den nachfolgenden Ansprüchen, nur zur Erläuterung dargestellt ist.

Die Erfindung betrifft ein Immunglobulin (Ig)-schwere Kette-Mini-Locus-Transgen-Konstrukt, umfassend DNA-Sequenzen, die humane Variable (V), Diversity (D), Joining (J) und konstante Regionen eines humanen Ig-Proteins codieren. Diese Sequenzen in operativer Weise mit Transkriptions-regulatorischen Sequenzen verbunden und fähig zum *in vivo*-Gen-Rearrangement sind, wenn sie in einem non-humanen transgenen Tier integriert sind, so daß ein rearrangiertes Gen gebildet wird, das ein humanes schwere Kette-Polypeptid codiert. Das Konstrukt umfaßt auch eine  $\mu$ -Klassenwechsel-Donor-Region 5' von einer  $\mu$  konstanten Region und eine humane  $\gamma$ -Klassenwechsel-Akzeptorregion zwischen der  $\mu$  konstanten Region und einer humanen  $\gamma$  konstanten Region. Die Klassenwechsel-Sequenzen sind in operativer Weise verbunden zur Durchführung des Klassenwechsels *in vivo* und zur Herstellung des humanen  $\gamma$  schwere Kette-Polypeptids.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Transgen-Konstrukts zum Herstellen eines transgenen non-humanen Tieres, welches fähig ist, ein humanes  $\gamma$ -schwere Kette-Polypeptid als Antwort auf Kontakt mit Antigenen herzustellen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren bereit zur Herstellung eines transgenen non-humanen Tieres, welches fähig ist, ein humanes  $\gamma$ -schwere Kette-Polypeptid herzustellen als Antwort auf Kontakt mit Antigen, wobei das Verfahren das funktionelle Zerstören des endogenen Immunglobulin-schwere Kette Locus umfaßt und das Einbauen eines erfindungsgemäßen Transgen-Konstrukts in das tierische Genom. Die Erfindung schließt weiterhin ein die Verwendung der Tiere, erhältlich aus diesen Verfahren zur Herstellung von B-Zellen, die  $\gamma$ -Immunglobulin produzieren, wobei das Immunglobulin eine humane schwere Kette hat und an ein ausgewähltes Antigen bindet.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von B-Zellen, die an ein ausgewähltes Antigen bindendes  $\gamma$ -Immunglobulin mit einer humanen schweren Kette herstellen. Das Verfahren umfaßt das Immunisieren eines Tieres, erhältlich nach dem vorstehenden Verfahren, mit dem Antigen und Screening auf B-Zellen aus dem Tier, die das Antigen binden. Die Erfindung betrifft weiterhin B-Zellen, erhältlich nach dem Verfahren und Hybridoma, erhältlich durch Immortalisieren solcher B-Zellen, z.B. Hybridoma, erhalten durch Fusionieren vorstehender B-Zellen mit Myelomzellen. Die Erfindung betrifft weiterhin ein



Verfahren zum Herstellen eines monoklonalen Antikörpers, umfassend das Kultivieren eines solchen Hybridoms.

5 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung der vorstehenden B-Zellen zum Herstellen eines Hybridoms oder des entsprechenden monoklonalen Antikörpers. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines an ein ausgewähltes Antigen bindendes  $\gamma$ -Immunglobulins mit humaner schwerer Kette, umfassend das Immunisieren eines Tieres, erhältlich durch ein wie vorstehend Immunisieren mit dem Antigen und das Gewinnen des  $\gamma$ -Immunglobulins aus dem Tier. Transgene Tiere sind  
10 nachstehend beschrieben, die rearrangierte, nicht-rearrangierte oder eine Kombination von rearrangierten und nicht-rearrangierten heterologen Immunglobulin schwere und leichte Kette-Transgen in der Keimbahn des transgenen Tieres enthalten. Im Fall jedes der vorstehenden Tiere werden funktionelle rearrangierte heterologe schwere und leichte Kette-Immunglobulin-Transgene in B-Zellen des transgenen Tieres gefunden.

15 Heterologe schwere und/oder leichte nicht-rearrangierte Immunglobulin-Transgene werden in einem non-humanen Tier/Wirt eingeführt zur Herstellung eines non-humanen transgenen Tieres, das ein schwere und ein leichte Kette-heterologes Immunglobulin-Gen enthält oder ein intermediäres Tier, das das eine oder das andere Transgen enthält. Nach dem Einbau in die  
20 Keimbahn solcher intermediärer Tiere bringen Kreuzungen zwischen einem enthaltend ein schwere Kette-Transgen und einem enthaltend ein leichte Kette-Transgen ein non-humanes transgenes Tier hervor, enthaltend sowohl das schwere als auch leichte heterologe Immunglobulin-Transgene.

25 Die Transgene schließen ein ein schwere Kette-Transgen, umfassend DNA mindestens codierend ein variables Gensegment, ein Diversity-Gensegment, ein Joining-Gensegment und ein konstante Region-Gensegment. Das Immunglobulin leichte Kette-Transgen umfaßt DNA, die mindestens ein variables Gensegment, ein Joining-Gensegment und ein konstante Region-Gensegment codiert. Die die leichte und schwere Kette-Gensegmente codierenden Gensegmente sind heterolog zu dem non-humanen transgenen Tier, weil sie abgeleitet sind oder entsprechend zu DNA, die Immunglobulin schwere und leichte Kette-Gensegmente codiert, aus  
30 einer Art, die nicht dem non-humanen transgenen Tier entspricht. Das Transgen kann so kon-



struiert werden, daß die einzelnen Gensegmente nicht-rearrangiert sind, d.h. nicht-rearrangiert, so daß sie eine funktionelle Immunglobulin leichte oder schwere Kette codieren. Solche nicht-rearrangierten Transgene erlauben die Rekombination der Gensegmente (funktionelles Rearrangement) und somatische Mutation der entstehenden rearrangierten Immunglobulin schwere und/oder leichte Ketten in dem non-humanen transgenen Tier, wenn dieses immunisiert wird mit Antigen.

Heterologe schwere und leichte Immunglobulin-Transgene können relativ große Fragmente nicht-rearrangierter heterologer DNA umfassen. Solche Fragmente umfassen typischerweise einen wesentlichen Teil von C, J (und im Fall der schweren Kette, D)-Segmenten aus einem heterologen Immunglobulin Locus. Weiterhin umfassen solche Fragmente auch einen wesentlichen Teil der variablen Gensegmente.

Die verschiedenen regulatorischen Sequenzen, z.B. Promotoren, Enhancer, Klassenwechselregionen, Rekombinationssignale und dergleichen umfassen in einigen Transgen-Konstrukten entsprechende Sequenzen, abgeleitet aus heterologer DNA. Alternativ können solche regulatorischen Sequenzen in das Transgen eingebaut werden aus derselben oder einer verwandten Art des erfindungsgemäß verwendeten non-humanen Tieres. Beispielsweise können humane Immunglobulin-Gensegmente in einem Transgen kombiniert werden mit einer Nager-Immunglobulin-Enhancer-Sequenz zur Verwendung in einer transgenen Maus.

Ein non-humanes transgenes Tier enthaltend Keimbahn nicht-rearrangierte leichte und schwere Immunglobulin-Transgene, die die Verbindung von VDJ während der B-Zelldifferenzierung durchmachen, kann immunisiert werden mit einem Antigen zur Induktion der Herstellung eines heterologen Antikörpers in einer B-Zelle mit sekundärem Repertoire. Diese Induktion verursacht somatische Mutation in den rearrangierten schwere und/oder leichte Kette-Transgenen, enthalten in Primär-Repertoire B-Zellen zur Herstellung eines heterologen Antikörpers mit hoher Affinität und Spezifität für das Antigen.

Solche Antikörper-herstellenden B-Zellen können immortalisiert werden durch Transformierung mit einem Virus, oder mit einem Onkogen-enthaltenden DNA-Konstrukt, oder alternativ, immortalisiert werden durch Fusionierung mit einer Myelomzelllinie zur Bildung Anti-



körper-sezenierender Hybridoma. In jedem Fall werden Klone ausgewählt mit ausreichender Affinität und Spezifität für ein besonderes Antigen zur Bereitstellung einer Quelle eines monoklonalen Antikörpers mit geringer Immunogenizität in den Arten, aus denen die Immunglobulin-Gensegmente der Transgene abgeleitet sind.

5

10

15

20

25

30

Vektoren und Verfahren zur Zerstörung der endogenen Immunglobulin Loci in dem non-humanen Tier verwenden ein Transgen, vorzugsweise einen positiv-negativ Selektionsvektor, welcher so konstruiert ist, daß er auf das funktionelle Zerstören abzielt einer Klasse von Gensegmenten, die eine schwere und/oder leichte Immunglobulin-Kette codieren und endogen ist für das non-humanen Tier, das in der Erfindung verwendet wird. Diese endogenen Gensegmente schließen ein Diversity, Joining und konstante Region-Gensegmente. Der positiv-negativ Selektionsvektor wird in Kontakt gebracht mit mindestens einer embryonalen Stammzelle aus einem non-humanen Tier, danach werden Zellen ausgewählt, in denen der positiv-negativ Selektionsvektor sich in das Genom des non-humanen Tieres mittels homologer Rekombination integriert hat. Nach der Transplantation ist das resultierende non-humane transgene Tier wesentlich beeinträchtigt bei der Bildung einer Immunglobulin-vermittelten Immunantwort in Folge der homologen Integration des Vektors. Diese immundefizienten non-humanen Tiere können danach zur Untersuchung von Immundefizienzen (Immunschwächen) verwendet werden oder verwendet werden als Empfänger von heterologen Immunglobulin schwere und leichte Kette-Transgenen.

Verfahren zur Herstellung eines synthetische variable Region-Gensegment-Repertoires zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Transgenen umfassen das Herstellen einer Population von Immunglobulin V-Segment-DNAs, wobei jede der V-Segment-DNAs ein Immunglobulin V-Segment codiert und an jedem Ende eine Schnittstellen-Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuclease enthält. Die Population der Immunglobulin V-Segment-DNAs wird danach verkettet zur Bildung des synthetischen Immunglobulin V-Segment-Repertoires.

Non-humane transgene Tiere können hergestellt werden, die funktionell rearrangierte heterologe schwere und leichte Kette-Immunglobulin-Transgene in der Keimbahn des transgenen Tieres enthalten. Diese Tiere enthalten Primär-Repertoire-B-Zellen, die solche rearrangierten schwere und leichte Transgene exprimieren. Solche B-Zellen sind in der Lage, somatische

Mutation durchzumachen, wenn sie immunisiert werden mit einem Antigen zur Bildung eines heterologen Antikörpers mit hoher Affinität und Spezifität für das Antigen.

5 Transgene Tiere können auch hergestellt werden, die Keimbahnzellen mit einem schweren und leichten Transgen enthalten, wobei eines der Transgene rearrangierte Gensegmente enthält, wohingegen das andere nicht-rearrangierte Gensegmente enthält. Das rearrangierte Transgen ist vorzugsweise ein leichte Kette-Immunglobulin-Transgen und das nicht-rearrangierte Transgen ist ein schwere Kette-Immunglobulin-Transgen.

10 Heterologe Antikörper können in einem transgenen Tier hergestellt werden, das Primär-Repertoire-B-Zellen mit rearrangierten schwere und leichte heterologe Immunglobulin-Transgene enthält. Diese transgenen Tiere können erhalten werden aus jedem der vorgenannten transgenen Tiere. Das transgene Tier mit nicht-rearrangierten schweren und leichte Transgenen, das transgene Tier mit rearrangierten schweren und leichten Transgenen oder das Tier  
15 mit einem rearrangierten und einem nicht-rearrangierten Transgen in der Keimbahn des Tieres, enthält somit Primär-Repertoire-B-Zellen mit rearrangierten heterologen schwere und leichte Immunglobulin-Transgene. In dem Verfahren wird ein gewünschter erster heterologer Antikörper hergestellt, der zur Bindung eines ersten Antigens in der Lage ist. Von den rearrangierten Immunglobulin schwere und leichte Transgenen in den Primär-Repertoire-B-Zellen solcher Tiere ist bekannt, daß sie Primär-Repertoire-Antikörper mit ausreichender Affinität für ein zweites bekanntes Antigen herstellen. In diesem Verfahren wird das non-humane  
20 transgene Tier immunisiert, aufeinanderfolgend oder gleichzeitig, mit dem ersten und zweiten Antigen zur Induktion der Herstellung des ersten heterologen Antikörpers durch somatische Mutation der rearrangierten Transgene. Die so erhaltenen sekundären Repertoire-B-Zellen  
25 werden dann wie vorstehend beschrieben manipuliert und immortalisiert zur Herstellung des gewünschten monoklonalen Antikörpers, der in der Lage ist, an das erste Antigen zu binden.

Die vorliegende Erfindung kann Plasmide verwenden, die nützlich sind zur Klonierung großer DNA-Fragmente (z.B. Immunglobulin-genomische Fragmente), die einen Ursprung  
30 der Replikation (ORI), eine Kopie-Kontrollregion (z.B. ROP, oder die Kopie-Kontrollregion von pACYC177, oder andere, die dem Fachmann bekannt sind), und einer Klonierungsstelle. Die Plasmide enthalten auch einen Terminator der Transkription (z.B. trpR oder andere, die

dem Fachmann bekannt sind) stromabwärts von endogenen Plasmid-abgeleiteten Promotoren, wie jenem des Ampicillin-Resistenzgens ( $\text{amp}^R$ ). Die Termination der Transkription liegt stromaufwärts von der Klonierungsstelle, so daß Transkripte, die am Promotor beginnen, stromaufwärts von der Klonierungsstelle beendet werden. Vorzugsweise ist die Klonierungs-

5 stelle umgeben von seltenen Schnittstellen. Diese Stellen bestehen aus sieben, acht oder mehr Nucleotiden, anstelle von sechs oder weniger Nucleotiden, die die häufigeren Schnittstellen ausmachen, z.B. Not I, Sfi I und Pac I. Seltene Schnittstellen schließen auch Schnittstellen ein, die Nucleotidsequenzen enthalten, die selten in natürlichen DNA-Sequenzen vorkommen; d.h. seltener als einmal in 8.000-10.000 Nucleotiden.

#### 10 KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

Fig. 1 zeigt die Komplementaritäts-bestimmenden Regionen CDR1, CDR2 und CDR3 und Gerüstregionen (framework regions) FR1, FR2, FR3 und FR4 in nicht-rearrangierter genomischer DNA und mRNA, exprimiert von einem rearrangierten Immunglobulin schwere Kette-

15 Gen,

Fig. 2 zeigt den humanen  $\lambda$ -Kette Locus,

20 Fig. 3 zeigt den humanen  $\kappa$ -Kette Locus,

Fig. 4 zeigt den humanen schwere Kette Locus,

Fig. 5 und 6 erläutern die Strategie zur Herstellung eines synthetischen V-Segment-Reper-

25 toires,

Fig. 7 erläutert die Strategie zum funktionellen Zerstören der endogenen Immunglobulin Loci,

30 Fig. 8 zeigt die T-Zell-vermittelte sekundäre Antwort, die zur Reifung der B-Zelle führt,

Fig. 9 zeigt die somatische Mutation und klonale Expansion der B-Zellen als Antwort auf zwei verschiedene Antigene,

5 Fig. 10 zeigt ein Transgen-Konstrukt mit einem rearrangierten IgM-Gen ligiert an ein 25 kb Fragment mit humaner  $\gamma 3$  und  $\gamma 1$  konstante Region gefolgt von einem 700 bp Fragment mit der 3'-Enhancer-Sequenz der Rattenkette,

10 Fig. 11 ist eine Restriktionskarte des humanen  $\kappa$ -Kette Locus, der die Fragmente darstellt, die zur Bildung eines leichten Kette-Transgens durch *in vivo* homologe Rekombination verwendet wurden,

Fig. 12 zeigt die Konstruktion von pGP1,

15 Fig. 13 zeigt die Konstruktion des Polylinkers in pGP1,

Fig. 14 zeigt die zur Konstruktion eines humanen schwere Kette-Transgen verwendeten Fragmente,

20 Fig. 15 zeigt die Konstruktion von pHIG1 und pCON1,

Fig. 16 zeigt die humanen C $\gamma$ 1-Fragmente, die in pRE3 (Ratten-Enhancer 3') inseriert wurden zur Bildung von pREG2,

25 Fig. 17 zeigt die Konstruktion von pHIG3' und pCON,

Fig. 18 zeigt das Fragment, das zur Konstruktion von Transgenen verwendete humane D-Regionsegmente,

30 Fig. 19 zeigt die Konstruktion von pHIG2 (D-Segment enthaltendes Plasmid),

Fig. 20 zeigt die Fragmente, die die humanen J $\kappa$ - und humane C $\kappa$ -Gensegmente abdecken und zur Konstruktion eines Transgens verwendet wurden,



Fig. 21 zeigt die Struktur von pE $\mu$ ,

Fig. 22 zeigt die Konstruktion von pKapH,

5

Fig. 23A bis 23D zeigen die Konstruktion eines positiv-negativ Selektionsvektors zum funktionellen Zerstören des endogene schwere Kette-Immunglobulin Locus der Maus,

10

Fig. 24A bis 24C zeigen die Konstruktion eines positiv-negativ Selektionsvektors zum funktionellen Zerstören der endogenen Immunglobulin leichte Kette Loci der Maus,

Fig. 25a bis e zeigen die Struktur eines kappa leichte Kette Targeting-Vektors,

15

Fig. 26a bis f zeigen die Struktur eines Maus schwere Kette Targeting-Vektors,

Fig. 27 zeigt die Karte des Vektors pGPE,

Fig. 28 zeigt die Struktur von Vektor pJM2,

20

Fig. 29 zeigt die Struktur von Vektor pCOR1,

Fig. 30 zeigt die Transgen-Konstrukte für pIGM1, pHCl und pHCl2,

25

Fig. 31 zeigt die Struktur von pyc2,

Fig. 32 zeigt die Struktur von pVGE1,

Fig. 33 zeigt die Testergebnisse der humanen Ig-Expression in einer pHCl-transgenen Maus,

30

Fig. 34 zeigt die Struktur von pJCK1,

Fig. 35 zeigt die Konstruktion einer synthetischen schwere Kette variablen Region.

Tabelle 1 zeigt die Sequenz des Vektors pGPe.

5 Tabelle 2 zeigt die Sequenz des Gens  $V_H49.8$ .

10 Das Design eines non-humanen transgenen Tieres, das auf Fremdanigen-Stimulation mit einem heterologen Antikörper-Repertoire antwortet, erfordert, daß im transgenen Tier enthaltene heterologe Immunglobulin-Transgene korrekt arbeiten entlang des ganzen Weges der B-Zell-Entwicklung. Entsprechend sind die Transgene so konstruiert, daß sie eines oder jedes der folgenden herstellen: (1) hohe und Zelltyp-spezifische Expression, (2) funktionelles Gen-Rearrangement, (3) Aktivierung der und Antwort auf den allelischen Ausschluß, (4) Expression eines ausreichenden Primär-Repertoires, (5) Signaltransduktion, (6) Klassenwechsel, (7) somatische Hypermutation und (8) Dominieren des transgenen Antikörper Locus während der Immunantwort.

20 Wie sich aus der folgenden Beschreibung ergibt, müssen nicht alle vorstehenden Kriterien erfüllt sein. Wenn beispielsweise die endogenen Immunglobulin Loci des transgenen Tieres funktionell zerstört sind, muß das Transgen nicht den allelischen Ausschluß aktivieren. Weiterhin, wenn das Transgen ein funktionell rearrangiertes schwere und/oder leichte Kette-Immunglobulin-Gen umfaßt, sind die zweiten Kriterien des funktionellen Gen-Rearrangements unnötig, zumindest für das Transgen, das bereits rearrangiert ist. Als Hintergrundliteratur der molekularen Immunologie, vgl. Fundamental Immunology, 2. Auflage, 1989, William E. Paul, Herausgeber Raven Press, N.Y.

25 Die Struktur und Herstellung der Antikörper

30 Immunglobuline, auch als Antikörper bekannt, sind eine Gruppe von Glycoproteinen, die im Serum und Gewebeflüssigkeiten aller Säuger vorhanden sind. Sie werden in großen Mengen durch Plasmazellen (hier auch als "sekundär-Repertoire-B-Zellen" bezeichnet) hergestellt, welche sich aus Vorläufer-B-Lymphozyten (hier als "Primär-Repertoire-B-Zellen" bezeichnet) entwickeln. Solche Primär-Repertoire-B-Zellen tragen Membran-gebundenes Immun-

globulin, welches ähnlich ist zu jenem, das produziert wird von der voll differenzierten sekundär-Repertoire-B-Zelle. Kontakt zwischen den Primär-Repertoire-B-Zellen und fremden Antigenen ist erforderlich für die Induktion der Antikörperbildung.

- 5 Die Grundstruktur aller Immunglobuline baut auf einer Einheit auf, bestehend aus zwei identischen leichten Polypeptidketten und zwei identischen schweren Polypeptidketten, die über Disulfidbindungen miteinander verknüpft sind. Jede leichte Kette umfaßt zwei Regionen, die bekannt sind als die variable leichte Kettenregion und die konstante leichte Kettenregion. In ähnlicher Weise umfaßt die Immunglobulin schwere Kette zwei Regionen, bezeichnet als die variable schwere Kettenregion und die konstante schwere Kettenregion. Die konstante Region für die schwere oder leichte Kette wird codiert von genomischen Sequenzen, bezeichnet als schwere oder leichte konstante Region-Gensegmente. Die Verwendung eines besonderen schwere Kette-Gensegments bestimmt die Klasse des Immunglobulins. Beispielsweise im Menschen bestimmen die  $\mu$ -konstante Region-Gensegmente die IgM-Klasse des Antikörpers, wohingegen die Verwendung eines  $\gamma$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$  oder  $\gamma 4$  konstante Region-Gensegments die IgG-Klasse von Antikörpern bestimmt, ebenso wie die IgG-Subklassen IgG1 bis IgG4.

- 20 Die variablen Regionen der schwere und leichte Immunglobulin-Ketten, zusammen enthaltend die Antigen-Bindungsdomäne des Antikörpers. Aufgrund der Notwendigkeit an Diversität dieser Region des Antikörpers, um die Bindung eines großen Bereichs an Antigenen zu ermöglichen, umfaßt die anfängliche oder Primär-Repertoire-variable Region codierende DNA eine Zahl unterschiedlicher DNA-Segmente abgeleitet von Familien spezifischer variabler Region-Gensegmente. Im Fall der leichten Kette-variable Region umfassen solche Familien variable (V) Gensegmente und Joining (J) Gensegmente. So wird die anfängliche variable Region der leichten Kette codiert von einem V-Gensegment und einem J-Gensegment, wobei jedes ausgewählt ist aus der Familie von V- und J- Gensegmenten enthalten in der genomischen DNA des Organismus. Die DNA, die die anfängliche oder Primär-Repertoire variable Region der schweren Kette codiert, umfaßt im Fall der schwere Kette variable Region ein schwere Kette V-Gensegment, ein schwere Kette Diversity-(D)-Gensegment und ein J-Gensegment, wobei jedes ausgewählt ist aus den geeigneten V-, D- und J-Familien der Immunglobulin-Gensegmente in genomischer DNA.

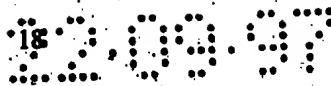
### Das primäre Repertoire

Der Vorgang zur Bildung von DNA, die schwere und leichte Kette-Immunglobulin-Gene codiert, geschieht primär in sich entwickelnden B-Zellen. Vor der Verbindung verschiedener Immunglobulin-Gensegmente finden sich die V-, D-, J- und konstanten (C)-Gensegmente zum größten Teil in Gruppen von V-, D-, J- und C-Gensegmenten in den Vorläufern von Primär-Repertoire-B-Zellen. Allgemein befinden sich alle Gensegmente für eine schwere oder leichte Kette in relativ geringem Abstand auf einem einzigen Chromosom.

Als "nicht rearrangierte" genomische DNA wird hier genomische DNA vor der Rekombination der verschiedenen Immunglobulin-Gensegmente bezeichnet. Während der B-Zell-Differenzierung werden jeweils eines der geeigneten Familienmitglieder der V-, D-, J- (oder nur V und J im Fall der leichten Kette-Gene) Gensegmente rekombiniert, um funktionell rearrangierte schwere und leichte Immunglobulingene zu bilden. Dieses funktionelle Rearrangement der variable Region Gensegmente bildet DNA, die eine funktionelle variable Region codiert. Dieser Gensegment-Rearrangement-Vorgang scheint eine Reihenfolge zu haben. Zunächst werden schwere Kette D-mit-J Verbindungen hergestellt gefolgt von schwere Kette V-mit-DJ Verbindungen und leichte Kette V-mit-J Verbindungen. Die DNA, die diese Ausgangsform einer funktionellen variablen Region in einer leichten und/oder schweren Kette codiert, wird als "funktionell rearrangierte DNA" oder "rearrangierte DNA" bezeichnet. Im Fall der schweren Kette wird diese DNA als "rearrangierte schwere Kette DNA", im Fall der leichten Kette als "rearrangierte leichte Kette DNA" bezeichnet. Die Wortwahl zur Bezeichnung des funktionellen Rearrangements der erfindungsgemäßen Transgene erfolgt in ähnlicher Weise.

Die Rekombination variabler Region Gensegmente unter Bildung funktioneller schwere und leichte Kette variable Regionen wird vermittelt durch Rekombinationssignalsequenzen (RSS's), die Rekombinations-kompetente V-, D- und J-Segmente flankieren. RSS's, die notwendig und ausreichend zum Steuern der Rekombination sind, umfassen ein paarweise-symmetrisches Heptamer, ein AT-reiches Nonamer und eine dazwischen liegende Abstandshalter (spacer)-Region von entweder 12 oder 23 Basenpaaren. Diese Signale sind konserviert zwischen den verschiedenen Loci und Arten, die D-J (oder V-J) Rekombination durchführen und sind funktionell austauschbar; vgl. Oettinger et al. (1990), Science 248, 1517-1523 und die darin enthaltenen Literaturstellen. Das Heptamer umfaßt die Sequenz CACAGTG oder sein

- Analogon gefolgt von einem Abstandshalter mit nichtkonservierter Sequenz und danach ein Nonamer mit der Sequenz ACAAAAACC oder sein Analogon. Diese Sequenzen befinden sich auf der J- oder stromabwärts liegenden Seite von jedem V- und D-Gensegment. Direkt vor den Keimbahn-D- und J-Segmenten liegen wiederum zwei Rekombinationssignalsequenzen, zunächst die Nonamersequenz und danach die Heptamersequenz, die wiederum durch eine nichtkonservierte Sequenz getrennt sind. Die Heptamer- und Nonamersequenzen, die auf ein  $V_L$ ,  $V_H$  oder D-Segment folgen, sind komplementär zu jenen Sequenzen, die vor den  $J_L$ , D- oder  $J_H$ -Segmenten liegen, mit denen sie rekombinieren.
- Die Abstandshalter zwischen den Heptameren und nonameren Sequenzen sind entweder 12 Basenpaare lang oder zwischen 22 und 24 Basenpaaren lang.
- Zusätzlich zu dem Rearrangement von V-, D- und J-Segmenten wird weitere Diversität im Primärrepertoire von Immunglobulin schwerer und leichter Kette mittels variabler Rekombination zwischen V- und J-Segmenten in der leichten Kette und zwischen den D- und J-Segmenten der schweren Kette erzeugt. Solche variable Rekombination wird erzeugt durch Variation des exakten Orts, an dem solche Segmente miteinander verbunden werden. Solche Variation in der leichten Kette geschieht typischerweise im letzten Kodon des V-Gensegments und dem ersten Kodon des J-Segments. Eine ähnliche Ungenauigkeit in der Verbindung geschieht auf dem schweren Kette-Chromosom zwischen den D- und  $J_H$ -Segmenten und kann sich auf bis zu 10 Nucleotide erstrecken. Weiterhin können mehrere Nucleotide inseriert werden zwischen D- und  $J_H$  und zwischen den  $V_H$  und D-Gensegmenten, die nicht von genomischer DNA codiert werden. Die Hinzufügung dieser Nucleotide ist bekannt als N-Region-Diversität.
- Nach dem VJ- und/oder VDJ-Rearrangement erzeugt die Transkription der rearrangierten variablen Region und einer oder mehrerer konstanter Region-Gensegmente stromaufwärts gelegen von der rearrangierten variablen Region ein primäres RNA-Transkript, das nach geeignetem RNA-Splicing zu einer mRNA führt, die eine Vollängen-schwere oder leichte Immunglobulinkette codiert. Solche schweren und leichten Ketten schließen eine Signalsequenz ein zur Bewirkung der Sekretion durch und/oder des Einbaus des Immunglobulins in die Transmembran-Region der B-Zelle. Die diese Signalsequenz codierende DNA ist im



ersten Exon des V-Segments enthalten, das die variable Region der schweren oder leichten Immunglobulinkette bildet. Geeignete regulatorische Sequenzen sind auch in der mRNA vorhanden zur Kontrolle der Translation der mRNA zum Herstellen der codierten schweren und leichten Immunglobulin-Polypeptide, die nach korrekter Assoziation miteinander ein Antikörpermolekül bilden.

Der Nettoeffekt solcher Rearrangements in den variable Region-Gensegmenten und die variable Rekombination, die während solcher Verbindungen auftreten können, ist die Herstellung eines primären Antikörper-Repertoires. Allgemein gilt, daß jede B-Zelle, die sich bis zu diesem Stadium differenziert hat, einen einzelnen Primär-Repertoire-Antikörper herstellt. Während dieses Differenzierungsvorgangs treten zelluläre Ereignisse auf, die das funktionelle Rearrangement der Gensegmente, die nicht im funktionell rearrangierten Ig-Gen enthalten sind, unterdrücken. Der Vorgang, durch den diploide B-Zellen solche Monospezifität bewahren, wird als allelischer Anschluß bezeichnet.

#### Das Sekundär-Repertoire

B-Zell-Klone, die Immunglobuline exprimieren aus dem Satz an Sequenzen umfassend das Primär-Repertoire, stehen unmittelbar zur Verfügung, um auf Fremdartigene zu antworten. Aufgrund der begrenzten Diversität erzeugt durch einfache VJ- und VDJ-Verbindung sind die durch die sogenannte Primärantwort hergestellten Antikörper von relativ geringer Affinität. Zwei verschiedene Typen von B-Zellen bilden diese anfängliche Antwort: Vorläufer von Primärantikörper-bildenden Zellen und Vorläufer von Sekundär-Repertoire-B-Zellen (Linton et al., 1989, Cell, 59, 1049-1059). Der erste Typ von B-Zellen reift zu IgM-sezernierenden Plasmazellen als Antwort auf bestimmte Antigene. Die anderen B-Zellen antworten auf anfänglichen Kontakt mit Antigenen durch den Eintritt in einen T-Zell-abhängigen Reifungsweg. Während dieser T-Zellabhängigen Reifung von B-Zellen wird eine zweite Stufe der Diversität erzeugt durch einen Vorgang, der als somatische Mutation bezeichnet wird (manchmal auch als Hypermutation bezeichnet). Diese Primär-Repertoire-B-Zellen verwenden die Immunglobulin-Moleküle auf ihren Oberflächen, um Fremdartigen zu binden und zu internalisieren. Wenn das Fremdartigen ein Protein ist oder physikalisch an ein anderes Proteinantigen gebunden ist, wird das Proteinantigen prozessiert und präsentiert auf der

Zelloberfläche durch ein Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Molekül gegenüber einer Helfer-T-Zelle, welche daraufhin die Reifung der B-Zelle induziert; Lanzavecchia, 1985, Nature, 314, 537. Die Gesamtreifung der B-Zelle ist bekannt als Sekundärantwort.

- 5 Während der T-Zell-abhängigen Reifung Antigen-stimulierter B-Zell-Klone ändert sich die Struktur des Antikörper-Moleküls auf der Zelloberfläche in zwei Arten: die konstante Region wechselt zu einem Nicht-IgM-Subtyp und die Sequenz der variablen Region wird modifiziert durch mehrfache einzelne Aminosäuresubstitutionen unter Bildung eines höher affinen Antikörper-Moleküls. Genau dieser Vorgang der somatischen Mutation, gefolgt von der Selektion höher affiner Klone ist es, der hochspezifische und festbindende Immunglobuline charakterisiert durch die Ig-vermittelte Immunantwort erzeugt.

- 10 Wie vorher angegeben, enthält jede variable Region einer schweren oder leichten Ig-Kette eine Antigen-Bindungsdomäne. Es ist durch Aminosäure- und Nucleinsäuresequenzierung bestimmt worden, daß somatische Mutation während der Sekundärantwort in der ganzen V-Region einschließlich der drei Komplementaritäts-bestimmenden Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3), auch als hypervariable Regionen 1, 2 und 3 bezeichnet, auftritt. Die CDR1- und CDR2-Regionen liegen innerhalb des variablen Gensegments, wohingegen die CDR3-Region zum großen Teil das Ergebnis der Rekombination zwischen V- und J-Gensegmenten oder V-, D- und J-Gensegmenten ist. Diejenigen Teile der variablen Region, die nicht aus CDR1, 2 oder 3 bestehen, werden allgemein als Gerüstregionen (framework regions), als FR1, FR2, FR3 und FR4 bezeichnet; vgl. Fig. 1. Während der Hypermutation wird die rearrangierte DNA mutiert, so daß neue Klone mit veränderten Ig-Molekülen entstehen. Diese Klone mit höheren Affinitäten für das Fremdantigen werden selektiv expandiert durch Helfer-T-Zellen, wodurch die Affinitätsreifung des exprimierten Antikörpers auftritt. Klonale Selektion führt typischerweise zur Expression von Klonen, die neue Mutationen in den CDR1-, 2- und/oder 3-Regionen besitzen. Jedoch treten auch Mutationen außerhalb dieser Regionen auf, die die Spezifität und Affinität der Antigen-Bindungsdomäne beeinflussen.

### Non-humane transgene Tiere für die Herstellung heterologer Antikörper

Non-humane transgene Tiere als ein Gegenstand der Erfindung werden hergestellt durch Einführen mindestens eines erfindungsgemäßen Immunglobulin-Transgens in eine Zygote oder einen frühen Embryo eines non-humanen Tieres. Die non-humanen Tiere, die erfindungsgemäß verwendet werden, umfassen im allgemeinen einen Säuger, der in der Lage ist, Immunglobulin-Gensegmente zur Erzeugung einer Primärantikörperantwort zu bilden und die zusätzlich in der Lage sind, eine Sekundärantwort zu bilden mittels somatischer Mutation solcher rearrangierter Ig-Gene. Ein besonders bevorzugtes non-humanes Tier ist die Maus oder andere Mitglieder der Nagerfamilie. Mäuse sind besonders nützlich, da ihr Immunsystem intensiv studiert ist, einschließlich der genomischen Organisation der Maus-schwere und leichte Immunglobulin Loci; vgl. z.B. Immunglobulin Genes, Academic Press, T. Honjo, F.W. Alt und T.H. Rabbitts, Herausgeber, 1989.

Jedoch ist die Erfindung nicht auf die Verwendung von Mäusen beschränkt. Vielmehr kann jeder non-humane Säuger fähig zur Bildung einer Primär- und Sekundärantikörperantwort verwendet werden. Solche Tiere schließen ein non-humane Primaten, wie Schimpansen, Rinder, Schafe und Schweinearten, andere Mitglieder der Nagerfamilie, z.B. Ratten ebenso wie Kaninchen und Meerschweinchen. Besonders bevorzugte Tiere sind Mäuse, Ratten, Kaninchen und Meerschweinchen, insbesondere bevorzugt ist die Maus.

Die Bezeichnung "Antikörper" bedeutet erfindungsgemäß ein Glycoprotein, umfassend mindestens zwei identische leichte Polypeptidketten und zwei identische schwere Polypeptidketten, die miteinander verbunden sind über Disulfidbindungen. Jede der schweren und leichten Ketten enthält eine variable Region, im allgemeinen den aminoterminalen Bereich der Polypeptidkette, die eine mit dem Antigen in Wechselwirkung tretende Bindungsdomäne enthält. Jede der schweren und leichten Polypeptidketten enthält auch eine konstante Region der Polypeptidketten (allgemein der Carboxy-terminale Teil), wobei einige der Sequenzen die Bindung des Immunglobulins an Wirtsgewebe vermitteln einschließlich verschiedene Zellen des Immunsystems, einiger phagocytischer Zellen und der ersten Komponente (C1q) des klassischen Komplementsystems.



Der Begriff "heterologer Antikörper" ist erfindungsgemäß definiert in bezug zu dem non-humanen transgenen Organismus, der solch einen Antikörper herstellt. Er wird bestimmt als ein Antikörper mit einer Aminosäuresequenz oder einer codierenden DNA-Sequenz entsprechend zu derjenigen in einem Organismus, der nicht aus dem non-humanen transgenen Tier besteht. So können vor dem Rearrangement eines Transgens enthaltend verschiedene schwere oder leichte Kette-Gensegmente solche Gensegmente leicht identifiziert werden, z.B. durch Hybridisierung oder DNA-Sequenzierung, daß sie von einer anderen Art Organismus sind, als der des transgenen Tieres. Beispielsweise können verschiedene Gensegmente aus dem menschlichen Genom verwendet werden in schweren und leichten Kette-Transgenen in einer nicht-rearrangierten Form. Solche Transgene werden in Mäuse eingebracht. Die nicht-rearrangierten Gen-Segmente des leichten und/oder schweren Kette-Transgens haben einzigartige DNA-Sequenzen für die menschliche Art, welche unterscheidbar sind von den endogenen Immunglobulin-Gensegmenten im Mausgenom. Sie können leicht nachgewiesen werden in nicht-rearrangierter Form in der Keimbahn und in somatischen Zellen, die nicht aus B-Zellen bestehen und in rearrangierter Form in B-Zellen.

Alternativ umfassen die Transgene rearrangierte schwere und/oder leichte Immunglobulin-Transgene. Spezifische Segmente solcher Transgene entsprechend zu funktionell rearrangierten VDJ- oder VJ-Segmenten enthalten Immunglobulin-DNA-Sequenzen, die auch klar unterscheidbar sind von den endogenen Immunglobulin-Gensegmenten in der Maus.

Solche Unterschiede in der DNA-Sequenz spiegeln sich auch wider in der Aminosäuresequenz, codiert durch solche menschlichen Immunglobulin-Transgene, im Vergleich zu denjenigen, codiert von Maus-B-Zellen. So können menschliche Immunglobulin-Aminosäuresequenzen in erfindungsgemäßen non-humanen transgenen Tieren nachgewiesen werden mit Antikörpern, spezifisch für Immunglobulin-Epitope, die von menschlichen Immunglobulin-Gensegmenten codiert werden.

Transgene B-Zellen mit nicht rearrangierten Transgenen, aus Menschen oder anderen Arten rekombinieren funktionell die geeigneten Gensegmente unter Bildung funktionell rearrangierter leichter und schwerer Kette variablen Regionen. Es versteht sich, daß die DNA solcher rearrangierter Transgene zum größten Teil nicht exakt der DNA-Sequenz der Gensegmente



entspricht, aus denen solche rearrangierten Transgene erhalten wurden. Dies ist in erster Linie wegen der Variationen eingeführt während der variablen Rekombination und aufgrund von Mutationen eingeführt durch Hypermutation während der Sekundärantwort. Trotz solcher Modifikationen in der DNA-(wie auch der Aminosäure-) Sequenz, ist ersichtlich, daß der Antikörper codiert von solchen rearrangierten Transgenen eine DNA- und/oder Aminosäuresequenz hat, die heterolog ist zu derjenigen, auf die man normalerweise im non-humanen Tier trifft, das zur Durchführung der Erfindung verwendet wird.

Der Begriff "wesentliche Identität" in Zusammenhang mit Polypeptiden bedeutet, daß das fragliche Polypeptid oder Protein mindestens etwa 30% Identität mit einem gesamten natürlich vorkommenden Protein oder einem Teil davon hat, meistens mindestens etwa 70% Identität, und vorzugsweise mindestens etwa 95% Identität. Die Begriffe "isoliert", "im wesentlichen rein" und "im wesentlichen homogen" werden hier miteinander austauschbar verwendet und beschreiben ein Polypeptid-Protein, das abgetrennt worden ist von Bestandteilen, die es natürlicherweise begleiten. Typischerweise ist ein monomeres Protein im wesentlichen rein, wenn mindestens etwa 60 bis 75% einer Probe ein einzelnes Polypeptid-Gerüst enthalten. Kleinere Varianten oder chemische Modifikationen teilen typischerweise dieselbe Polypeptidsequenz. Ein im wesentlichen reines Protein wird typischerweise mehr als etwa 85 bis 90% in einer Proteinprobe, vorzugsweise mindestens 95% und insbesondere mindestens 99% rein sein. Proteinreinheit oder -homogenität kann durch eine Anzahl bekannter Methoden gezeigt werden, wie Polyacrylamid-Gelelektrophorese, eine Proteinprobe, gefolgt durch Sichtbarmachen einer einzelnen Polypeptidbande auf einem Polyacrylamidgel nach Färben. Für bestimmte Zwecke wird Hochauflösung benötigt und HPLC oder eine ähnliche Methode zur Aufreinigung verwendet. Ein Polypeptid ist im wesentlichen frei von natürlich-assoziierten Komponenten, wenn es von den nativen Verunreinigungen abgetrennt wird, die es in seinem natürlichen Zustand begleiten. So wird ein Polypeptid, das synthetisiert wird in einem zellulären System unterschiedlich von der Zelle, aus der es natürlicherweise stammt, im wesentlichen frei sein von natürlich-assoziierten Komponenten.



### Nicht-rearrangierte Transgene

Der Begriff "nicht-rearrangiertes Immunglobulin schwere Kette-Transgen" umfaßt erfindungsgemäß DNA, codierend mindestens ein variables Gen-Segment, ein Diversitäts-Gen-segment, ein Joining-Gensegment und eine konstante Region-Gensegment. Jedes der Gen-segmente dieses schwere Kette-Transgens ist abgeleitet von, oder hat eine Sequenz entsprechend zu DNA codierend Immunglobulin schwere Kette-Gensegmente aus einer Art, die nicht aus dem non-humanen Tier besteht, in das dieses Transgen eingeführt wurde. In ähnlicher Weise umfaßt ein "nicht-rearrangiertes Immunglobulin leichte Kette-Transgen" erfindungsgemäß DNA, codierend mindestens ein variables Gensegment, ein Joining-Gensegment und mindestens ein konstante Region-Gensegment, wobei jedes Gensegment dieses leichte Kette-Transgens abgeleitet ist von oder eine Sequenz entsprechend zu DNA codierend Immunglobulin leichte Kette-Gensegmente aus einer Art, die nicht aus dem non-humanen Tier besteht, in das dieses leichte Kette-Transgen eingeführt wird.

Solche schweren und leichten Kette-Transgene enthalten die vorstehend identifizierten Gen-segmente in einer nicht-rearrangierten Form. So sind zwischengelagert zwischen V-, D- und J-Segmente in dem schweren Kette-Transgen und zwischen den V- und J-Segmenten des leichte Kette-Transgens geeignete Rekombinationssignalsequenzen (RSS's). Zusätzlich umfassen solche Transgene auch geeignete RNA-Splicing-Signale zur Verbindung eines konstante Region-Gensegments mit der VJ- oder VDJ-rearrangierten variablen Region.

In dem Umfang, daß das schwere Kette-Transgen mehr als ein C-Region-Gensegment enthält, z.B. C $\mu$  und C $\gamma$ 1 aus dem menschlichen Genom, werden, wie nachstehend erläutert, "Klassenwechselregionen" stromaufwärts von jedem der konstanten Region-Gensegmente eingebaut und stromabwärts von den variable Region-Gensegmenten, um die Rekombination zwischen solchen konstanten Regionen zu erlauben zum Immunglobulin-Klassenwechsel, z.B. von IgM nach IgG. Solche schwere und leichte Immunglobulin-Transgene enthalten auch Transkriptionskontrollsequenzen, einschließlich Promotorregionen stromaufwärts gelegen von den variable Region-Gensegmenten, die OCTA und TATA Motive enthalten.



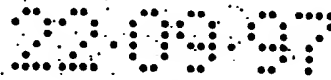
5 Zusätzlich zu Promotoren werden andere regulatorische Sequenzen, die in erster Linie in Zellen der B-Zelllinie funktionieren, verwendet. So wird beispielsweise ein vorzugsweise zwischen dem J- und konstante Region-Gensegment auf dem leichte Kette-Transgen gelegene leichte Kette-Enhancer-Sequenz verwendet zur Erhöhung der transgenen Expression, wodurch der allelische Ausschluß erleichtert wird. Im Fall des schwere Kette-Transgens werden auch regulatorische Enhancer verwendet.

10 Obwohl die vorstehenden Promotor- und Enhancer-regulatorischen Kontrollsequenzen in allgemeiner Form beschrieben worden sind, können solche regulatorischen Sequenzen heterolog zu dem non-humanen Tier sein, abgeleitet von der genomischen DNA, aus der die heterologen Transgen-Immunglobulin-Gensegmente erhalten werden. Andererseits werden solche regulatorischen Gensegmente abgeleitet von den entsprechenden regulatorischen Sequenzen im Genom des non-humanen Tieres, oder nah verwandter Arten, die das schwere und leichte Transgen enthalten. Solche regulatorischen Sequenzen werden verwendet zum Maximieren  
15 der Transkription und Translation des Transgens, um so den allelischen Ausschluß zu induzieren und relativ hohe Mengen der Expression des Transgens zu ermöglichen.

20 Erfindungsgemäß leiten sich die Immunglobulin-Gensegmente enthalten in schweren und leichten Ig-Transgenen ab von oder haben Sequenzen, die der genomischen DNA, cDNA oder Teilen davon aus einer menschlichen Quelle entsprechen.

25 Sofern solche Gensegmente funktionell rearrangierten Type mutiert werden im non-humanen transgenen Tier, wird der heterologe Antikörper mutiert von solchen schwere und leichten Transgenen eine Aminosäuresequenz haben und eine Gesamt-Sekundär- und Tertiär-Struktur, die speziell brauchbar sind gegen ein gewünschtes Antigen bei therapeutischer Verwendung in Menschen verwendet wird. Zusätzlich zeigen solche Antikörper im wesentlichen reduzierte Immunogenizität verglichen zu Antikörpern, welche "fremd" sind für Menschen.

30 Mit von Menschen abgeleiteten Gensegmenten sind die non-humanen transgenen Tiere, die solche schweren und leichten Transgene enthalten, in der Lage, eine Ig-vermittelte Immunantwort gegen ein diesem Tier verabfolgtes spezifisches Antigen zu erzeugen. B-Zellen werden hergestellt in einem solchen Tier, die in der Lage sind, die heterologen humanen Anti-



körper herzustellen. Nach dem Immortalisieren und der Selektion für einen geeigneten monoklonalen Antikörper (Mab), z.B. ein Hybridom, wird eine Quelle des therapeutischen human-monoklonalen Antikörpers bereitgestellt. Solche humanen Mabs haben eine bedeutend reduzierte Immunogenizität, wenn sie therapeutisch an Menschen verabfolgt werden.

Beispiele für Antigene, die verwendet werden können zur Erzeugung heterologer Antikörper in den erfindungsgemäßen transgenen Tieren, die humane Immunglobulin-Transgene enthalten, umfassen bakterielles, virales und Tumorantigen ebenso wie besondere menschliche B- und T-Zell-Antigene assoziiert mit Transplantatabstoßung oder Autoimmunität.

Es versteht sich, daß die hier beschriebene Erfindung leicht angepaßt werden kann, um Immunglobulin-Gensegmente von einer anderen Art als dem Menschen verwenden zu können. Beispielsweise, zusätzlich zur therapeutischen Behandlung von Menschen mit erfindungsgemäßen Antikörpern, können therapeutische Antikörper codiert von geeigneten Gensegmenten verwendet werden, um monoklonale Antikörper herzustellen zur Verwendung in der Tiermedizin. Beispielsweise wird die Behandlung von Vieh und Haustieren mit Art-verwandten monoklonalen Antikörpern auch durch die Erfindung beabsichtigt. Solche Antikörper können in ähnlicher Weise erzeugt werden durch die Verwendung von Transgenen mit Immunglobulin-Gensegmenten aus Arten wie Rind, Schaf, Schwein, Pferd, Hund, Katze und dergleichen.

#### Klassenwechsel

Die Verwendung von  $\mu$ - oder  $\delta$ -konstanten Regionen wird zum großen Teil bestimmt durch alternatives Splicing, welches die Koexpression von IgM und IgD in einer einzelnen Zelle erlaubt. Die anderen schwere Kette-Isotypen ( $\gamma$ ,  $\alpha$  und  $\epsilon$ ) werden nativ nur exprimiert nach einem Gen-Rearrangement-Ereignis, das die C $\mu$ - und C $\delta$ -Exons beseitigt. Dieser Gen-Rearrangement-Vorgang, bezeichnet als Klassenwechsel, geschieht durch Rekombination zwischen sogenannten Klassenwechsel-Segmenten, die sich direkt stromaufwärts von jedem schweren Kette-Gen (ausgenommen  $\delta$ ) befinden. Die einzelnen Klassenwechsel-Segmente sind zwischen 2 und 10 kb lang und bestehen in erster Linie aus kurzen sich wiederholenden



Sequenzen. Der genaue Ort der Rekombination unterscheidet sich für die einzelnen Klassenwechsel-Ereignisse.

Die Fähigkeit einer transgenen Konstruktion, den Klassenwechsel von Isotypen durchzuführen während der B-Zell-Reifung, ist in transgenen Mäusen nicht direkt getestet worden. Jedoch sollten Transgene diese Funktion ausführen können; Durdik et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2346-2350) mikroinjizierten ein rearrangiertes Maus- $\mu$ -schwere Kette-Gen-Konstrukt und fanden, daß in vier unabhängigen Mauslinien ein hoher Anteil der transgenen B-Zellen die Transgen-codierte variable Region eher assoziiert mit IgG als mit IgM exprimiert. So scheint es, daß der Isotyp-Klassenwechsel stattgefunden hat zwischen dem Transgen und der endogenen  $\gamma$ -konstanten Region auf einem anderen Chromosom.

Der Begriff Klassenwechsel-Sequenz bedeutet solche DNA-Sequenzen, die verantwortlich sind für die Klassenwechsel-Rekombination. Eine "Klassenwechsel-Donor"-Sequenz, typischerweise eine  $\mu$ -Klassenwechselregion, wird 5' (d.h. stromaufwärts) liegen von der während der Klassenwechsel-Rekombination zu beseitigenden Konstruktregion. Die "Klassenwechsel-Akzeptor"-Region wird zwischen der zu beseitigenden Konstruktregion und der Austausch-konstanten Region (z.B.  $\gamma$ ,  $\epsilon$ , etc.) liegen. Da es keinen spezifischen Ort gibt, wo die Rekombination immer auftritt, wird die endgültige Gensequenz typischerweise nicht vorhersagbar aus dem Konstrukt sein.

Die Klassenwechsel (S) Region des  $\mu$ -Gens,  $S_{\mu}$ , liegt etwa 1 bis 2 kb 5' von der codierenden Sequenz und ist zusammengesetzt aus zahlreichen Tandemwiederholungen (tandem repeats) von Sequenzen der Form  $(GAGCT)_n(GGGGT)$ , wobei n gewöhnlich 2 bis 5 ist, aber bis zu 17 reichen kann; vgl. T. Nikaido et al., 1981, Nature, 292, 845-848).

Ähnliche sich intern wiederholende (repetitive) Klassenwechsel-Sequenzen reichend über mehrer Kilobasen sind 5' von den anderen  $C_H$ -Genen gefunden worden. Die  $S_{\alpha}$ -Region ist sequenziert worden und es wurde gefunden, daß sie aus sich in Tandemweise wiederholenden 80-bp-Homologie-Einheiten besteht, wohingegen  $S_{\gamma_2a}$ ,  $S_{\gamma_2b}$  und  $S_{\gamma_3}$  alle sich wiederholende 49-bp-Homologie-Einheiten enthalten, die zueinander sehr ähnlich sind; vgl. P. Szurek et al., 1985, J. Immunol., 135, 620-626 und T. Nikaido et al., 1982, J. Biol. Chem., 257, 7322-



7329). Alle sequenzierten S-Regionen schließen ein zahlreiches Auftreten von pentameren GAGCT und GGGGT, die die Grundwiederholungselemente des  $S_{\mu}$ -Gens sind (T. Nikaido et al., 1982, J. Biol. Chem., 257, 7322-7329); in den anderen S-Regionen sind diese Pentamere nicht genau in Tandemwiederholung wie in  $S_{\mu}$ , stattdessen sind sie in größere Wiederholungseinheiten eingebettet.

Die  $S_{\gamma 1}$ -Region hat eine zusätzliche Struktur höherer Ordnung: zwei direkte Wiederholungssequenzen flankieren jede der beiden Gruppen aus 49-bp-Tandem-Repeats; vgl. M.R. Mowatt et al., 1986, J. Immunol., 136, 2674-2683). Es wurde gefunden, daß Klassenwechsel-Regionen der menschlichen H-Kette-Gene ihren Mausehomologen sehr ähnlich sind. Allgemein kann, im Unterschied zur enzymatischen Maschinerie der V-J-Rekombination, die Klassenwechsel-Maschinerie anscheinend unterschiedliche Aneinanderreihungen (alignments) der sich wiederholenden homologen Regionen der Keimbahn S-Vorläufer akzeptieren und dann die Sequenzen an verschiedenen Positionen innerhalb der Aneinanderreihung verbinden; vgl. T.H. Rabbitts et al., 1981, Nucleic Acid Res., 9, 4509-4524 und J. Ravetch et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 6734-6738).

Die Induktion des Klassenwechsels scheint mit reinen (sterile) Transkripten verbunden zu sein, die stromaufwärts der Klassenwechsel-Segmente beginnen (Lutzker et al., 1988, Mol. Cell. Biol. 8, 1849; Stavnezer et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 7704; Esser und Radbruch, 1989, EMBO J., 8, 483; Berton et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2829; Rothman et al., 1990, Int. Immunol. 2, 621). Beispielsweise korreliert die beobachtete Induktion des  $\gamma 1$ -sterile Transkripts durch IL-4 und Hemmung durch IFN- $\gamma$  mit der Beobachtung, daß IL-4 den Klassenwechsel nach  $\gamma 1$  in B-Zellen in Kultur fördert, während IFN- $\gamma$  die  $\gamma 1$ -Expression hemmt. Idealerweise sollen dann die zur Durchführung des Klassenwechsels bestimmten Transgen-Konstrukte einschließen alle cis-wirkenden Sequenzen einschließen, die notwendig zum Steuern dieser sterilen Transkripte sind. Ein alternatives Verfahren zum Klassenwechsel in transgenen Mäusen ( $\sigma\mu$  und  $\epsilon\mu$ ) umfaßt den Einschluß von 400 bp direkten Wiederholungs (repeat) Sequenzen, die das menschliche  $\mu$ -Gen flankieren (Yasui et al., 1989, Eur. J. Immunol., 19, 1399). Homologe Rekombination zwischen diesen beiden Sequenzen deletiert das  $\mu$ -Gen in B-Zellen, die nur IgD positiv sind.

### Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper können nach verschiedenen bekannten Methoden erhalten werden. Kurz dargestellt, Milzzellen aus einem Tier immunisiert mit einem gewünschten Antigen werden immortalisiert, gewöhnlich durch Fusion mit einer Myelomzelle (vgl. Köhler und Milstein, Eur. J. Immunol., 6, 511-519, 1976). Alternative Verfahren zur Immortalisierung schließen ein Transformation mit Epstein-Barr-Virus, Onkogenen, oder Retroviren, oder anderen bekannten Verfahren. Aus einzelnen immortalisierten Zellen entstehende Kolonien werden gescreent auf die Herstellung von Antikörpern der gewünschten Spezifität und Affinität für das Antigen. Die Ausbeute an monoklonalen Antikörpern hergestellt von solchen Zellen kann erhöht werden durch verschiedene Methoden, einschließlich Injektion in die Peritoneal Höhle eines Wirbeltier-Wirts. Verschiedene auf diesen Gebieten nützlichen Methoden sind diskutiert beispielsweise in Harlow und Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1988, einschließlich: Immunisierung von Tieren zur Herstellung von Immunglobulinen; Herstellung von monoklonalen Antikörpern; Markierung von Immunglobulinen zur Verwendung als Sonden; Immunaффinitätsreinigung und Immunoassays.

### Das transgene Primär-Repertoire

#### A. Die menschlichen Immunglobulin Loci

Ein wichtiges Erfordernis für die Funktion des Transgens ist die Herstellung eines Primär-Antikörper-Repertoires, das genügend unterschiedlich ist, um eine Sekundär-Immunantwort für einen breiten Bereich an Antigenen auszulösen. Die Ausdehnung der menschlichen Immunglobulin Loci, die die verschiedenen Gensegmente für schwere und leichte Ketten codieren, ist ziemlich groß. Beispielsweise nehmen im menschlichen Genom die drei unterschiedlichen Loci für den  $\lambda$ -leichte Kette Locus, den  $\kappa$ -leichte Kette Locus und den schwere Kette Locus zusammen mehr als 5 Mb DNA ein oder fast 0,2% des gesamten Genoms. Jeder Locus besteht aus multiplen variablen Segmenten, die rekombinieren während der B-Zell-entwicklung mit einem Joining-Region-Segment (und der schwere Kette Locus mit Diversity-Region-Segmenten) zur Bildung vollständiger V-Region Exons. Solche rearrangierten leichte

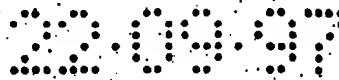




Kette-Gene bestehen aus drei Exons: einem Signalpeptid-Exon, einem variable Region-Exon und einem konstante Region-Exon. Das rearrangierte schwere Kette-Gen ist etwas komplexer. Es besteht aus einem Signalpeptid-Exon, einem variable Region-Exon und einer Tandemanordnung von mehrfach-Domäne konstante Region-Regionen, wobei jede von ihnen codiert wird durch mehrere Exons. Jede der konstanten Region-Gene codiert den konstanten Teil einer unterschiedlichen Klasse von Immunglobulinen. Während der B-Zellentwicklung werden V-Region-benachbarte konstante Regionen beseitigt, was zur Expression neuer schwerer Kette-Klassen führt. Für jede schwere Kette-Klasse bringen alternative Muster von RNA und Splicing sowohl transmembran als auch sezernierte Immunglobuline hervor.

Etwa 40% der humanen Serum-Antikörper-Moleküle enthalten  $\lambda$ -leichte Ketten. Die Struktur dieses Locus, der auf Chromosom 22 liegt, ist der am geringsten charakterisierte (Fig. 2). Er besteht aus einer unbekannten Anzahl an V-Segmenten stromaufwärts von einer Tandemanordnung von sechs konstante Region-Genen, wobei jedes von ihnen mit einem einzelnen J-Segment verknüpft ist. Zusätzlich wurden zwei weitere konstante Region-Segmente mit assoziierten J-Segmenten isoliert, obwohl ihre Verbindung mit dem Rest der  $\lambda$ -Anhäufung nicht gezeigt worden war und es ist nicht bekannt, ob sie benutzt worden sind. E. Selsing et al., "Immunoglobulin Genes", Academic Press, T. Honjo, F.W. Alt und T.H. Rabbitts, Herausgeber, 1989).

Der  $\kappa$ -leichte Kette Locus erstreckt sich über drei Anhäufungen (Cluster) auf Chromosom 2 (Fig. 3). Die ersten beiden Cluster, die 850 bzw. 250 kb abdecken, enthalten nur variable Region-Gensegmente. Das dritte Cluster, das etwa 1 Mb abdeckt, enthält etwa 40 V-Gensegmente stromaufwärts eines Clusters von 5 J-Segmenten, gefolgt von einem einzelnen konstante Region-Gensegment. Insgesamt sind 84 V-Gensegmente identifiziert worden und etwa von der Hälfte von ihnen wird gedacht, daß sie Pseudogene sind (Zachau, 1989, in Immunoglobulin Genes, Academic Press, T. Honjo, F.W. Alt und T.H. Rabbitts, Herausgeber, Seiten 91-110). Etwa 25 kb stromabwärts von der CK-Region gibt es ein "k-beseitigendes Element" ( $\kappa$ de). Die  $\kappa$ de-Sequenz rekombiniert mit stromaufwärts Sequenzen, was zur Beseitigung führt der  $\kappa$ -konstanten Region im  $\lambda$ -leichte Kette-exprimierende B-Zellen. Dies führt zu isotypischem Anschluß in Zellen, die erfolgreich sowohl  $\kappa$ - als auch  $\lambda$ -Gene rearrangieren.



Der menschliche schwere Kette-Locus ist der größte und vielfältigste. Er besteht aus etwa 200 V-Gensegmenten, die 2 Mb überspannen, etwa 30 D-Gensegmente, die etwa 40 kb überspannen, sechs J-Segmente geclustert in einem 3 kb-Bereich und neun konstante Region-Gensegmente, die sich über ungefähr 300 kb erstrecken. Der gesamte Locus überspannt ungefähr 2,5 Mb des distalen Teils des langen Arms von Chromosom 14 (Fig. 4). Die schwere Kette-V-Segmente können in sechs Familien aufgrund der Sequenzähnlichkeit eingruppiert werden. Es gibt etwa 60 Mitglieder der  $V_H1$ -Familie, 30  $V_H2$ -Segmente, 80  $V_H3$ -Segmente, 30  $V_H4$ -Segmente, drei  $V_H5$ -Segmente und ein  $V_H6$ -Segment. J.E. Berman et al., 1988, EMBO J., 7, 727-738. Im menschlichen schwere Kette Locus sind die Mitglieder der einzelnen V-Familien vermischt im Gegensatz zum Maus Locus, wo verwandte V-Segmente angehäuft sind. Das einzige Mitglied der  $V_H6$ -Familie ist das proximalste der V-Segmente und wird zugeordnet innerhalb von 90 kb der konstanten Region-Gensegmente; vgl. Sato T. et al., 1988, Biochem. Biophys. Res. Comm., 154, 265-271. Alle funktionellen D- und J-Segmente scheinen in dieser 90 kb-Region zu liegen (Siebenlist et al., 1981, Nature, 294, 631-635; Matsuda et al., 1988, EMBO J., 7, 1047-1051; Buluwela et al., 1988, EMBO J., 7, 2003-2010; Ichihara et al., 1988, EMBO J., 7, 4141-4150; Berman et al., 1988, EMBO J., 7, 727-738).

## B. Genfragment-Transgene

### 1. Schwere Kette-Transgen

Vorzugsweise umfassen Immunglobulin schwere und leichte Kette-Transgene nicht-rearrangierte genomische DNA aus Menschen. Im Fall der schweren Kette umfaßt ein bevorzugtes Transgen ein NotI-Fragment mit einer Länge zwischen 670 und 830 kb. Die Länge dieses Fragments ist nicht eindeutig, da die 3'-Restriktionsstelle nicht genau zugeordnet worden ist. Es ist jedoch bekannt, daß sie zwischen den  $\alpha 1$ - und  $\psi\alpha$ -Gensegmenten (vgl. Fig. 4) liegt. Dieses Fragment enthält Mitglieder aller sechs bekannten  $V_H$ -Familien, der D- und J-Gensegmente, ebenso wie der  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 1$  und  $\alpha 1$  konstanten Regionen. Berman et al., 1988, EMBO J., 7, 727-738. Eine transgene Mauslinie, die dieses Transgen enthält, exprimiert korrekterweise alle der schwere Kette-Klassen erforderlich zur B-Zellentwicklung ebenso wie

ein genügend großes Repertoire variabler Regionen, um eine Sekundärantwort für die meisten Antigene auszulösen.

## 2. Leichte Kette-Transgen

5

Ein genomisches Fragment, das alle notwendigen Gensegmente und regulatorischen Sequenzen aus einem menschlichen leichten Kette-Locus enthält, kann in ähnlicher Weise konstruiert werden. Solch ein Konstrukt ist in den Beispielen beschrieben.

10

## C. Transgene intrazellulär hergestellt durch *in vivo*-Rekombination

15

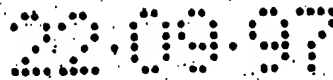
Es ist nicht notwendig, den gesamten oder Teile des schweren Kette-Locus in einem einzigen DNA Fragment zu isolieren. So kann beispielsweise das 670-830 kb NotI-Fragment aus dem menschlichen Immunglobulin schwere Kette-Locus gebildet werden im non-humanen Tier während der Transgenese. Solche *in vivo*-Transgen-Konstruktion wird hergestellt durch Einführen zweier oder mehrerer überlappender DNA-Fragmente in einen embryonalen Nucleus des non-humanen Tieres. Die überlappenden Teile der DNA-Fragmente haben demnach Sequenzen, die im wesentlichen homolog sind. Mit Hilfe der im Nucleus enthaltenen Rekombinasen rekombinierten die überlappenden DNA-Fragmente homolog in korrekter Orientierung zur Bildung des 670-830 kb NotI-schwere Kette-Fragments.

20

25

Es versteht sich jedoch, daß die *in vivo*-Transgen-Konstruktion verwendet werden kann zur Bildung aller Immunglobulin-Transgene, die aufgrund ihrer Größe andernfalls schwierig oder unmöglich herzustellen oder zu manipulieren wären durch die gegenwärtigen Verfahren. So ist die *in vivo*-Transgen-Konstruktion nützlich zum Herstellen von Immunglobulin-Transgenen, die größer sind als DNA-Fragmente, die man durch YAC-Vektoren manipulieren kann (Murray und Szostak, 1983, Nature, 305, 189-193). Diese *in vivo*-Transgen-Konstruktion kann verwendet werden zum Einführen im wesentlichen der gesamten Immunglobulin Loci aus einer Art, die nicht aus der des non-humanen transgenen Tieres besteht, in das ein non-humanes Tier. Obwohl mehrere Gruppen erfolgreich Bibliotheken mit 50-200 kb an DNA-Fragmenten in YAC-Vektoren konstruiert haben (Burke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 5898-5902) und die Polyaminkondensation verwendet haben zum Herstellen von YAC-

30



5 Bibliotheken im Bereich von 200 bis etwa 1000 kb (McGormick et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9991-9995), können vermutlich mehrfach überlappende Fragmente, die in wesentlichen mehr als das 670-830 kb NotI-Fragment der menschlichen konstante Region-Immunglobulin-Loci enthalten, leicht größere Transgene durch die hier offenbarten Verfahren bilden.

Zusätzlich zur Bildung genomischer Immunglobulin-Transgene kann die *in vivo*-homologe Rekombination auch verwendet werden zur Bildung von "Mini-Locus"-Transgenen, wie in den Beispielen beschrieben.

10

Bei der Verwendung der *in vivo*-Transgen-Konstruktion hat jedes überlappende DNA-Fragment vorzugsweise eine überlappende im wesentlichen homologe DNA-Sequenz zwischen dem Endteil des einen DNA-Fragments und dem Endteil eines zweiten DNA-Fragments. Solche überlappenden Teile von DNA-Fragmenten umfassen vorzugsweise etwa 500 bp bis etwa 15 2000 bp, insbesondere 1,0 kb bis 2,0 kb. Homologe Rekombination überlappender DNA-Fragmente unter Bildung von Transgenen *in vivo* ist weiterhin beschrieben in der US-Patentanmeldung ("Intracellular Generation of DNA by Homologous Recombination of DNA Fragments"), eingereicht am 29. August 1990, unter U.S.S.N. 07/574,747.

20

#### D. Mini-Locus-Transgene

Hier bedeutet der Begriff "Immunglobulin-Mini-Locus" eine DNA-Sequenz (die innerhalb einer längeren Sequenz sein kann), gewöhnlich von weniger als etwa 150 kb, typischerweise zwischen etwa 25 und 100 kb, die mindestens eine der nachfolgenden Sequenzen enthalten: 25 ein funktionelles variable (V)-Gensegment, ein funktionelles Joining (J)-Region-Segment, ein funktionelles konstante (C)-Region-Gensegment und - im Fall eines schwere Kette-Mini-Locus ist - ein funktionelles Diversity (D)-Region-Segment, so daß diese DNA-Sequenz mindestens eine wesentliche Diskontinuität (z.B. eine Deletion, gewöhnlich von mindestens etwa 2 bis 5 kb, vorzugsweise 10 bis 25 kb oder mehr, relativ zur homologen genomischen 30 DNA-Sequenz) enthält. Eine leichte Kette-Mini-Locus-Transgen wird mindestens 25 kb lang sein, typischerweise 65 kb. Ein schwere Kette-Transgen wird typischerweise etwa 70 bis 80 kb lang sein, vorzugsweise mindestens etwa 60 kb mit zwei konstanten Regionen in



operativer Weise verbunden mit Klassenwechsel-Regionen gegen mindestens etwa 30 kb mit einer einzelnen konstanten Region und unvollständigen Klassenwechsel-Regionen. Weiterhin sind die einzelnen Elemente des Mini-Locus vorzugsweise in der Keimbahn-Konfiguration und in der Lage, Gen-Rearrangement durchzumachen in der Prä-B-Zelle eines transgenen Tieres, um so funktionelle Antikörpermoleküle mit vielfältigem Antigenspezifitäten zu exprimieren, die vollständig von Elementen des Mini-Locus codiert werden.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfassen Immunglobulin schwere und leichte Kette-Transgene ein oder mehrere jeder der V-, D-, J- und C-Gensegmente. Mindestens eines von jedem geeigneten Typ Gensegment wird eingebaut in das Mini-Locus-Transgen. Im Hinblick auf C-Segmente für das schwere Kette-Transgen ist bevorzugt, daß das Transgen mindestens ein  $\mu$ -Gensegment enthält und mindestens ein weiteres konstante Region-Gensegment, vorzugsweise ein  $\gamma$ -Gensegment und insbesondere ein  $\gamma 3$ - oder  $\gamma 1$ -Gensegment. Dies gestattet den Klassenwechsel zwischen IgM- und IgG-Formen des codierten Immunglobulins zur Ermöglichung der somatische Mutation und zur Bildung einer sezernierbaren Form von hochaffinen non-IgM-Immunglobulin. Andere konstante Region-Gensegmente können auch verwendet werden, wie solche, die für die Herstellung von IgD, IgA und IgE codieren.

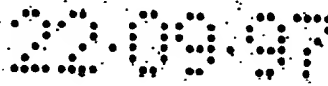
Die schwere Kette-J-Region-Segmente im Menschen umfassen sechs funktionelle J-Segmente und drei Pseudogene, geclustert in einem 3 kb Abschnitt von DNA. Unter der Annahme ihrer relativ kompakten Größe und der Fähigkeit, diese Segmente zusammen mit dem  $\mu$ -Gen und dem 5'-Teil des  $\delta$ -Gens auf einen einzelnen 23 kb SFI/Spel-Fragment zu isolieren (Sado et al., 1988, Biochem. Biophys. Res. Comm., 154, 264-271), ist bevorzugt, daß alle J-Region-Gensegmente im Mini-Locus-Konstrukt verwendet werden. Da dieses Fragment die Region zwischen dem  $\mu$ - und  $\delta$ -Gen überspannt, ist wahrscheinlich, daß es alle der 3'-cis-verknüpften regulatorischen Elemente erforderlich für die  $\mu$ -Expression enthält. Da dieses Fragment die gesamte J-Region einschließt, enthält es weiterhin den schwere Kette-Enhancer und die  $\mu$ -Klassenwechsel-Region (Mills et al., 1983, Nature, 306, 809; Yancopoulos und Alt, 1986, Ann. Rev. Immunol., 4, 339-368). Es enthält auch die Transkriptionsstartstellen, die die VDJ-Verbindung auslösen zur Bildung von Primärrepertoire-B-Zellen (Yancopoulos und Alt, 1985, Cell, 40, 271-281). Alternativ kann ein 36 kb BssHII/Spel1-



Fragment, welches einen Teil der D-Region einschließt, verwendet werden anstelle des 23 kb SfiI/SpeII-Fragments. Die Verwendung eines solchen Fragments erhöht die Menge an 5'-flankierender Sequenz zur Erleichterung des wirksamen D-mit-J-Verbindens.

- 5 Die menschliche D-Region besteht aus 4 oder 5 homologen 9 kb Subregionen, die in Tandem verknüpft sind (Siebenlist et al., 1981, Nature, 294, 631-635). Jede Subregion enthält bis zu 10 einzelne D-Segmente. Einige dieser Segmente sind kartiert worden und in Fig. 4 dargestellt. Zwei verschiedene Strategien werden verwendet zum Erzeugen einer Mini-Locus-D-Region. Bei der ersten Strategie werden nur die D-Segmente verwendet, gelegen in einem
- 10 kurzen aneinandergrenzenden Abschnitt von DNA, der einschließt ein oder 2 der sich wiederholenden D-Subregionen. Ein Kandidat ist ein einzelnes 15 kb Fragment, das 12 einzelne D-Segmente enthält. Dieses Stück DNA besteht aus zwei aneinandergrenzenden EcoRI-Fragmenten und ist vollständig sequenziert worden (Ichihara et al., 1988, EMBO J., 7, 4141-4150). 12 D-Segmente sollten ausreichend sein für ein Primärrepertoire. Im Hinblick auf die
- 15 verstreute Natur der D-Region ist eine alternative Strategie ist das miteinander Legieren mehrerer nicht aneinandergrenzender D-Segment-enthaltender Fragmente, um so ein kleineres Stück DNA mit einer größeren Zahl von Segmenten zu bilden.

- 20 Mindestens eines und vorzugsweise mehr als ein V-Gensegment wird verwendet zur Konstruktion des schwere Kette-Mini-Locus-Transgens. Ein 10 bis 15 kb Stück DNA, das ein oder zwei nicht-rearrangierte V-Segmente enthält zusammen mit flankierenden Sequenzen, wird isoliert. Ein Klon mit solcher DNA wird ausgewählt unter Verwendung eines Sondenmoleküls, erzeugt aus einzigartigen 5'-Sequenzen, bestimmt aus der transkribierten V-Region eines charakterisierten menschlichen Hybridoms wie dasjenige, das Anti-
- 25 Cytomegalovirus-Antikörper herstellt (Newkirk et al., 1988, J. Clin. Invest., 81, 1511-1518). Die 5'-untranslatierte Sequenz der schwere Kette-mRNA wird verwendet zur Konstruktion eines einzigartigen Nucleotid-Sondenmoleküls (vorzugsweise etwa 40 Nucleotide lang) zum Isolieren des ursprünglichen Keimbahn-V-Segments, das diesen Antikörper erzeugte. Die Verwendung eines V-Segments, von dem bekannt ist, daß es in ein Gen eingebaut wird, das
- 30 kodiert für einen Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen, sichert nicht nur, daß dieses V-Segment funktional ist, sondern hilft bei der Analyse der Transgen-Beteiligung an Sekundär-Immunantworten. Dieses V-Segment wird fusioniert mit der Mini-Locus-D-Region und kon-



stante Region-Fragmenten, wie vorher erläutert, zum Herstellen eines Mini-Locus-schwere Kette-Transgens.

5 Alternativ wird ein großer, aneinandergrenzender Abschnitt DNA mit multiplen V-Region-Segmenten isoliert aus einer YAC-Bibliothek. Unterschiedlich große Stücke DNA mit unterschiedlichen Zahlen von V-Region-Segmenten werden untersucht auf ihre Fähigkeit zur Bildung eines menschlichen Antikörper-Repertoires in dem Mini-Locus-Transgen-Konstrukt. Es ist auch möglich, ein großes Fragment aus mehreren nicht-aneinandergrenzenden V-Segment-enthaltenden Fragmenten zu bauen unter Verwendung von YAC-Vektoren (Murray und Szostak, 1983, Nature, 305, 189-193), F-Faktor-basierten Plasmide (O'Connor et al., 1989, Science, 244, 1307-1312) oder die vorstehend erwähnte *in vivo*-Konstruktion unter Verwendung der Rekombination überlappender Fragmente. Alternativ kann ein synthetisches V-Region-Repertoire (nachstehend beschrieben) verwendet werden.

15 Ein Mini-Locus leichte Kette-Transgen kann in ähnlicher Weise konstruiert werden aus dem menschlichen  $\lambda$ - oder  $\kappa$ -Immunglobulin-Locus. Konstruktion eines  $\kappa$ -leichte Kette-Mini-Locus ist sehr ähnlich zur Konstruktion des schweren Kette-Mini-Locus, jedoch ist sie viel einfacher aufgrund ihrer geringeren Größe und geringeren Komplexität. Der menschliche  $\kappa$ -Locus enthält nur ein konstante Region-Segment. Dieses Segment, zusammen mit 5'- und 3'-Enhancern, und allen 5 funktionellen J-Segmente, kann isoliert werden auf einem einzelnen 20 10 kb DNA-Fragment. Dieses Fragment wird koinjiziert zusammen mit einer Mini-Locus-V-Region, konstruiert wie beschrieben für den schwere Kette-Mini-Locus.

25 So kann beispielsweise ein Immunglobulin-schwere Kette-Mini-Locus-Transgen-Konstrukt, z.B. von etwa 75 kb codierend V-, D-, J- und konstante Region-Sequenzen, gebildet werden aus einer Vielzahl an DNA-Fragmenten, mindestens zwei, drei oder vier von denen jedes entweder eine V-Region-Sequenz, eine D-Region-Sequenz, eine J- und konstante Region-Sequenz, eine D- und J- und konstante Region-Sequenz oder eine konstante Region-Sequenz, wobei jede Sequenz im wesentlichen homolog zu menschlichen Gen-Sequenzen ist. Vorzugsweise sind die Sequenzen in operativer Weise verknüpft mit Transkriptions-regulatorischen Sequenzen und in der Lage, Rearrangement durchzumachen. Mit zwei oder mehr 30 geeignet platzierten konstante Region-Sequenzen (z.B.  $\mu$  und  $\gamma$ ) und Klassenwechsel-Regio-



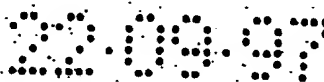
nen tritt auch Klassenwechsel-Rekombination auf. Ein Beispiel für ein leichte Kette-Trans-  
gen-Konstrukt in ähnlicher Weise gebildet aus einer Vielzahl an DNA-Fragmenten, im  
wesentlichen homolog zu menschlicher DNA und fähig zum Durchführen des Rearrange-  
ments, umfaßt mindestens zwei, drei oder vier DNA-Fragmente, die V-, D- und konstante  
Regionen codieren, wobei jedes Fragment entweder eine V-Region-Sequenz, J- und konstante  
Region-Sequenz oder eine konstante Region-Sequenz umfaßt.

#### E. Verfahren zur Bestimmung funktioneller V-Gensegmente und zur Bildung eines synthetischen V-Segment-Repertoires

Von den verschiedenen Familien von Gensegmenten, d.h. V-, D-, J- und C-Region-Genseg-  
menten, übertrifft die Zahl von V-Gensegmenten im allgemeinen bei weitem die Zahl ent-  
sprechender Gensegmente für die D-, J- und C-Region-Gensegmente. In Analogie zum  
Kaninchensystem, bei dem ein einzelnes V-Gensegment verwendet wird von etwa 90% der  
hergestellten Antikörper (Knight und Becker, 1990, Cell, 60, 963-970) ist es möglich,  
schwere und leichte Transgene mit einer begrenzten Zahl von V-Region-Gensegmenten und  
mit bis zu einem einzigen V-Region-Gensegment herzustellen. Deshalb ist es erwünscht, ein  
Verfahren zur Bestimmung zu haben, welche V-Region-Gensegmente verwendet werden von  
einem bestimmten Organismus, wie dem Menschen, beim Aufbau einer Immunglobulin-  
vermittelten Immunantwort. Gemäß diesem Ansatz ist ein einzelnes V-Gensegment in Kom-  
bination mit den J- oder DJ-Gensegmenten, in der Lage, genügend Diversität an CDR3  
bereitzustellen zur Herstellung eines Primärrepertoires, das nach somatischer Mutation in der  
Lage ist, weitere Diversität über die ganze variable Region bereitzustellen, z.B. an CDR3 und  
CDR2 für die Produktion von hochaffinen Antikörpern.

Verfahren und Vektoren können bereitgestellt werden zur Bestimmung, welche V-Genseg-  
mente gewöhnlich verwendet werden von einem Organismus während einer Immunantwort.  
Dieses Verfahren basiert auf der Bestimmung, welche V-Segmente in cDNAs synthetisiert  
von B-Zell-PolyA<sup>+</sup>-RNA gefunden werden. Diese Verfahren und Vektoren können auch ver-  
wendet werden zum Erleichtern der Konstruktion eines synthetischen V-Segment-Repertoires.





Der Entwurf dieser Strategie zum Identifizieren schwerer Kette-V-Segmente und zum Erzeugen eines synthetischen V-Segment-Repertoires ist in Fig. 5 und 6 dargestellt. Die Strategie ist in ähnlicher Weise anwendbar zum Identifizieren leichter Kette-V-Segmente mit geeigneter Modifikation. Der erste Schritt ist die Konstruktion eines Klonierungsvektors. Das bevorzugte Ausgangsmaterial ist ein DNA-Fragment (etwa 2 kb) mit einem nicht-rearrangierten V-Segment zusammen mit 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen. Dieses Fragment wird kloniert in ein Plasmid wie pGP1 oder pGP2 nachstehend beschrieben mit einer Polylinkerstelle flankiert von seltenen Restriktionsstellen bezeichnet als "w" und "z" in den Fig. 5 und 6 (die Polylinker- und Restriktionsstellen von pGP1, pGP2 sind in den Beispielen beschrieben). Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese wird dann verwendet zum Einführen zweier neuer Restriktionsstellen, "x" und "y" (im allgemeinen ist jedes etwa 6 Nucleotide lang). Restriktionsstelle "x" wird plaziert etwa 20 Nucleotide vom 3'-Ende des Introns zwischen dem Signal- und dem V-Segment-Exon. Restriktionsstelle "y" wird plaziert etwa 20 Nucleotide 3' von der V-Segment-Verbindungsstelle innerhalb des 23 bp Abstandshalters zwischen den Heptamer- und Nonamer-Rekombinationssignalsequenzen. Das Schneiden des resultierenden Plasmids mit Enzym "x" und "y" beseitigt das zweite Exon (V-Segment). Es hinterbleiben die 5'-flankierenden Sequenzen, der V-Region-Promotor, das Signalpeptid-Exon, das Intron, eine Lücke, flankiert von "x"- und "y"-Enden, die äußere Hälfte der Rekombinationssignalsequenz und die 3'-flankierenden Sequenzen. Dieses Plasmid wird pVH1 genannt.

Der zweite Schritt ist die Synthese von vier Gruppen Oligonucleotid-Primern, P1 bis P4. P1 und P2 sind nicht-einzigartige Oligomere mit jeweils etwa 50 Nucleotiden, die verwendet werden zum Primen doppelsträngiger cDNA-Synthese. P1 beginnt (von 5' nach 3') mit etwa 20 Nucleotiden Sequenz-homolog zum Antisense-Strang der Rekombinationssignalsequenzen pVH1 (einschließlich der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym "y") und setzt sich fort mit etwa 30 Nucleotiden Antisense-Sequenz, die mit etwa den letzten 30 Nucleotiden der VH-Gerüst (framework)-Region 3 (FR3) hybridisieren. Zufällige Basen werden eingebaut über etwa die letzten 30 Nucleotide, um so eine Gruppe von Primern herzustellen, die hybridisieren mit allen der verschiedenen VH-Familien. Das zweite Oligonucleotid, P2, ist in der Sense-Orientierung und ist homolog zu etwa 50 Nucleotiden, beginnend mit der Restriktionsstelle "x" in pVH1. Dies schließt die "x"-Restriktionsstelle ein, über etwa die letzten 20



Nucleotide des Introns und etwa die ersten 30 Nucleotide von FR1. Nochmals sind die letzten 30 Nucleotide nicht einzigartig, um sich so verschiedenen Region-Segmenten anzupassen.

5 Oligonucleotide P3 und P4 sind homolog zu etwa den ersten 20 Nucleotiden von P1 bzw. P2. Diese Oligos sind einzigartig, um so die Einführung neuer Mutationen in die V-Segmente zu verhindern. Diese Oligos werden zum Amplifizieren doppelsträngiger cDNA nach der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet.

10 Die 3'-terminalen Teile der Primer P1 und P2, die in der Lage sind, zu Hybridisieren an und zu Primen die Synthese von den variablen Segmenten des schweren oder leichten Immunglobulin Locus können in an sich bekannter Weise leicht bestimmt werden. Beispielsweise sind die Nucleotidsequenzen einer Zahl humaner VH-Gene veröffentlicht; vgl. z.B. Berman, J.E. et al., 1988, EMBO J., 7, 727-738 und Kabat, E.A. et al., 1987, Sequences of Protein of Immunological interests, U.S. Dept. Health & Human Services, Washington, D.C. Zur Identifizierung und/oder Erzeugung von V-Segmenten des humanen leichten Immunglobulin Locus, können in ähnlicher Weise die geeigneten 3'-Sequenzteile der Primer P1 und P2 leicht  
15 bestimmt werden aufgrund veröffentlichter Sequenzen; vgl. z.B. Kabat, E.A. et al., *supra*. Im allgemeinen sind diese Nucleotid-Positionen, die konserviert sind unter verschiedenen V-Segmenten auch konserviert im 3'-Teil der P1- und P2-Primer. Für diese Nucleotid-Positionen, wobei Variation beobachtet wird unter variablen Segmenten, sind solche Nucleotid-Positionen in den entsprechenden P1- und P2-Primern in ähnlicher Weise variiert zum Bereitstellen von P1- und P2-Primern, welche einen Pool von Primern umfassen, die in der Lage  
20 sind, mit verschiedene VH- oder VL-Segmente zu hybridisieren.

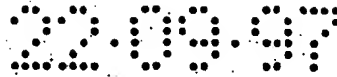
25 Der nächste Schritt ist Verwendung dieser Oligonucleotid-Primer zum Erzeugen einer Bibliothek von menschlichen schwere Kette-V-Region-cDNA-Sequenzen im Vektor pHV1. P1 wird verwendet, um die Synthese des ersten cDNA-Stranges aus humaner B-Zell-PolyA<sup>+</sup>-RNA zu primen. Die RNA wird basisch hydrolysiert und die Synthese des zweiten Stranges wird geprimt mit P2. Doppelsträngige cDNA voller Länge wird dann aufgereinigt auf einem  
30 Acrylamidgel, elektroeluiert und verwendet als Template für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Amplifikation unter Verwendung von Oligonucleotid-Primern P3 und P4. Alternativ wird die cDNA zuerst synthetisiert in an sich bekannter Weise und diese cDNA wird als



Template für den P1-geprinten Reaktor verwendet. Das amplifizierte Produkt (etwa 0,3 kb) wird dann Gel-aufgereinigt, mit Restriktionsenzymen "x" und "y" gespalten und in pHV1 kloniert.

5 Die resultierende cDNA-Bibliothek repräsentiert eine synthetische genomische Bibliothek variabler Region-Segmente und bietet drei Vorteile gegenüber einer konventionellen genomischen Bibliothek variabler Segmente. Erstens enthält diese Bibliothek keine Pseudogene, während eine konventionelle Bibliothek bis zu 50% Pseudogen-Sequenzen enthalten kann. Zweitens ist die synthetische Bibliothek kompakter als eine konventionelle Bibliothek mit einem funktionellen V-Segment pro 2 kb DNA im Gegensatz zu einem funktionellen Segment pro 20 kb. Letztlich beläßt dieser Ansatz die V-Segment-Promotor-Sequenz zugänglich für Manipulation.

15 Solch eine cDNA-Bibliothek kann vorbelastet sein im Hinblick auf bestimmte Keimbahn-V-Segmente aufgrund der unterschiedlichen Expression. Die zwei Quellen der Vorbelastung sind: (i) unterschiedliche Raten der V-Segment-Rekombination und (ii) unterschiedliche Selektion der V-Segment-exprimierenden B-Zell-Klone. Mit der ersten Quelle der Vorbelastung wird auf zwei Arten umgegangen. Erstens, fötales Gewebe wird als Quelle der B-Zell-RNA vermieden, da die Vorbelastung am stärksten ausgedrückt ist im fötalen Immunglobulin-Repertoire. Zweitens, die halb-zufälligen (semi-random) Primer, P1 und P2, werden 20 in Pools eingeteilt, von denen jeder selektiv kreuzhybridisiert mit unterschiedlichen V-Segment-Familien. Diese Primer werden dann verwendet zum Herstellen von 4 bis 6 separaten Bibliotheken, so daß gesichert wird, daß alle V-Region-Familien repräsentiert sind. Mit der zweiten Quelle der Vorbelastung, unterschiedlicher Selektion von B-Zell-Klonen, wird auf 25 zwei analoge Arten umgegangen. Erstens, eine Quelle von RNA wird verwendet, die den minimalen Teil der Antigen-selektierten B-Zellen einschließt. Lymphknoten und Milz werden vermieden. Adultes Knochenmark ist eine Quelle nicht-selektierter B-Zellen. Jedoch kann es einen hohen Anteil transkribierter Pseudogen-Sequenzen aus B-Vorläufer-Zellen enthalten. Eine weitere Quelle von RNA ist Gesamtblut. 90% der zirkulierenden B-Zellen sind 30 unreife  $\mu$ - oder  $\mu$ ,  $\delta$ -exprimierende Zellen und sind vor kurzem in das Knochenmark eingewandert. Jedoch kann die Größe der Antigen-selektierten IgG-exprimierenden Zellen variieren abhängig vom Immunstatus des Individuums. Deshalb wird die isolierte PolyA<sup>+</sup>-RNA



überprüft auf selektierte B-Zell-Sequenzen durch Northern-Blot-Hybridisierung mit  $\gamma$ -spezifischen Sonden. Wenn es praktischer ist, Milz-RNA zu verwenden und wenn diese RNA einen hohen Anteil von IgG-Sequenzen enthält, wird ein zweiter Ansatz zur Minimierung der Selektion der Vorbelastung verwendet. Der erste Strang der cDNA-Synthese wird geprimt  
 5 mit einem etwa 40 Nucleotid konstante Region-Exon 2 Primer, der spezifisch ist für IgM-Transkripte. Die Synthesen des zweiten Stranges werden dann geprimt durch P2 und eine dritte Synthese-Runde wird geprimt durch P1. Die cDNA aus dieser dritten Synthese-Runde stellt das Template für die PCR-Amplifikation unter Verwendung von P3 und P4 bereit.

10 Wenn einmal die variable Region-Bibliothek erzeugt worden ist, können die darin verwendeten V-Segmente durch Standardverfahren identifiziert werden, z.B. mittels Sequenzierung und/oder Hybridisierung mit Familien-spezifischen oder Segment-spezifischen Oligonucleotiden ebenso wie mit differenzieller Amplifizierung durch PCR-Verfahren. Solche Charakterisierung der V-Segment-Bibliothek stellt Information bereit zur Häufigkeit und Verteilung  
 15 der V-Segment-Verwendung in einem bestimmten Organismus. Dies ermöglicht die Identifizierung von V-Segmenten, die zur Konstruktion der verschiedenen erfindungsgemäßen Transgene verwendet werden können. So können ein oder mehrere vorherrschende V-Gen-segmente verwendet werden in dem vorstehend beschriebenen Mini-Locus-Transgen-Konstrukt. Weiterhin können ausgewählte Klone aus einer solchen Bibliothek verwendet werden  
 20 zum Identifizieren genomischer Fragmente mit häufig verwendeten V-Segmenten zum Erleichtern der Identifizierung genomischer Fragmente mit einem bestimmten gewünschten V-Segment.

Zusätzlich kann ein synthetisches V-Segment-Repertoire konstruiert werden durch Verkettung von Bibliothek-Sequenzen. Große sich wiederholende Transgen-Tandem-Anordnungen mit Hunderten von Kopien der injizierten Sequenz, werden gewöhnlich erzeugt bei der Herstellung transgener Mäuse. Diese Tandem-Anordnungen sind gewöhnlich ziemlich stabil. Um jedoch die Stabilität der synthetischen V-Region zu sichern, werden vorzugsweise Blöcke zufälliger (random) DNA zwischen jedes 2 kb V-Region-Segment eingeführt. Diese Blöcke  
 25 zufälliger DNA werden hergestellt durch Verdau und nachfolgendem nochmaligen Ligieren genomischer DNA, um so die Insertion dominanter regulatorischer Elemente zu verhindern. Genomische DNA wird vorzugsweise verdaut durch 4 häufig schneidende Restriktions-  
 30

enzyme: AluI, DpnI, HaeIII und RsaI. Dieser Verdau erzeugt glatt-endende Fragmente mit einer durchschnittlichen Länge von 64 Nucleotiden. Fragmente im Größenbereich von 50 bis 100 Nucleotiden werden eluiert aus einem Acrylamidgel und religiert. Die religierte DNA wird teilweise verdaut mit MboI und nach Größe aufgetrennt. Fragmente im Bereich von 0,5 bis 2 kb werden kloniert in die BamHI- oder BglII-Stelle des Polylinkers des zur Herstellung von pVH1 verwendeten Vektors.

Die Zufalls-Sequenz-Bibliothek wird kombiniert mit der synthetischen V-Segment-Bibliothek zum Herstellen eines synthetischen V-Segment-Repertoires. Inserts aus der Zufalls-Sequenz-Bibliothek werden herausgeschnitten mit den Enzymen "w" und "z" und von Vektorsequenzen abgetrennt. Inserts aus der synthetischen V-Segment-Bibliothek werden isoliert durch Schneiden mit "w" und "z". Vor dem Aufreinigen der V-Segment-Inserts wird diese DNA behandelt mit Kalbsdarm-Phosphatase zum Verhindern der Selbst-Ligation. Die V-Segment-Inserts werden dann ligiert zusammen mit den zufälligen Inserts zum Herstellen einer alternierenden Tandem-Anordnung, umfassend ein synthetisches V-Segment-Repertoire. Diese Ligationsmischung wird nach Größe ausgewählt auf einem Sucrose-Gradienten und die 50 bis 100 kb-Fraktion wird mikroinjiziert zusammen mit beispielsweise einem D-J-konstanten Mini-Locus-Konstrukt. Durch direktes Injizieren des synthetischen V-Segment-Repertoires ohne dazwischenliegenden Klonierungsschritt ist es möglich, einen Vorteil zu ziehen aus der Tatsache, daß Tandem-Anordnungen injizierter Fragmente an einer einzigen Stelle inseriert werden. In diesem Fall sind solche Tandem-Anordnungen nicht vollständig redundant, sondern führen zu weiterer Diversität. Alternativ kann das synthetische V-Segment-Repertoire kombiniert werden mit einem D-J-C-Mini-Locus zum Bilden eines schweren Kette-Transgens.

Ein synthetisches leichte Kette-Immunglobulin-Segment-Repertoire kann in ähnlicher Weise konstruiert werden unter Verwendung geeigneter Primer für den leichte Kette-Locus.

#### Funktionelles Zerstören der endogenen Immunglobulin Loci

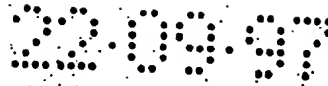
Von der Expression erfolgreich rearrangierte Immunglobulin schwere und leichten Transgene wird erwartet, daß sie einen dominanten Effekt durch die Unterdrückung des Rearrangements

der endogenen Immunglobulin-Gene in dem non-humanen transgenen Tier hat. Jedoch ist eine weitere Art zum Herstellen eines non-humanen transgenen Tieres, das frei ist von endogenen Antikörpern, ist durch Mutieren der endogenen Immunglobulin-Loci. Unter Verwendung embryonaler Stammzell-Technologie und homologer Rekombination kann das endogene Immunglobulin-Repertoire leicht ausgelöscht werden. Im folgenden wird die funktionelle Beschreibung der Maus-Immunglobulin-Loci beschrieben. Die offenbarten Vektoren und Verfahren jedoch können leicht angepaßt werden zur Verwendung in anderen non-humanen Tieren.

10 Kurz gesagt, umfaßt diese Technologie die Inaktivierung eines Gens, durch homologe Rekombination, in einer pluripotenten Zelllinie, die in der Lage ist, sich zu Keimzellgewebe zu differenzieren. Ein DNA-Konstrukt, das eine veränderte Kopie eines Maus-Immunglobulin-Gens enthält, wird eingeführt in die Kerne embryonaler Stammzellen. In einem Teil der Zellen rekombiniert die eingeführte DNA mit der endogenen Kopie des Mausgens und ersetzt sie mit der veränderten Kopie. Zellen mit dem neu gentechnisch erzeugten Schaden werden  
15 injiziert in einen Wirtmausembryo, der in ein Empfängerweibchen reimplantiert wird. Einige dieser Embryos entwickeln sich zu chimären Mäusen, die Keimzellen besitzen, die sich vollständig von der Mutanten-Zelllinie ableiten. Aus diesem Grund ist es durch Züchten der chimären Mäuse möglich, einen neuen Mausstamm mit dem eingeführten genetischen Schaden zu erhalten (Übersichtsartikel von Capecchi, 1989, Science, 244, 1288-1292).

Da der Maus- $\lambda$ -Locus nur zu 5% zu den Immunglobulinen beiträgt, ist die Inaktivierung der schwere Kette und/oder  $\kappa$ -leichte Kette-Loci ausreichend. Es gibt drei Wege zum Zerstören jedes dieser Loci, nämlich Deletion der J-Region, Deletion des J-C-Intron-Enhancers und  
25 Zerstören der konstante Region-codierenden Sequenz durch Einführung eines Stopkodons. Die letzte Möglichkeit ist die direkteste im Hinblick auf die Herstellung eines DNA-Konstrukts. Eliminierung des  $\mu$ -Gens zerstört die B-Zellreifung, wodurch der Klassenwechsel zu irgendeinem der funktionellen schwere Kette-Segmente verhindert wird. Die Strategie zum Ausknocken (Ausschalten) dieser Loci wird nachstehend erläutert.

30 Um die Maus- $\mu$ - und  $\kappa$ -Gene zu zerstören, werden Targeting-Vektoren verwendet auf der Grundlage des Entwurfs verwendet von Jaenisch und Mitarbeitern (Zijlstra et al., 1989;



Nature, 342, 435-438) zum erfolgreichen Zerstören des Maus- $\beta 2$ -Mikroglobulin-Gens. Das Neomycin-Resistenzgen (neo) aus dem Plasmid pMCIneo wird in die codierende Region des Zielgens inseriert. Das pMCIneo-Insert verwendet eine Hybridviral-Promotor/Enhancer-Sequenz, um die Neoexpression anzutreiben. Dieser Promotor ist aktiv in embryonalen Stammzellen. Aus diesem Grund kann neo verwendet werden als selektierbarer Marker auf die Integration des knock-out-Konstrukts. Das HSV-Thymidin-Kinase (TK)-Gen wird an das Ende des Konstrukts hinzugefügt als ein negativer Selektionsmarker gegen zufällige Insertionsereignisse (Zijlstra et al., *supra*).

Die Targeting-Vektoren zum Zerstören des schwere Kette-Locus sind in Fig. 7 abgebildet. Die Hauptstrategie zum Zerstören des schwere Kette-Locus ist die Eliminierung der J-Region. Diese Region ist ziemlich kompakt in der Maus und überspannt nur 1,3 kb. Zur Konstruktion eines Gen-Targeting-Vektors wird ein 15 kb KpnI-Fragment mit allen Sezernierungsformen von A konstante Region-Exons aus Maus-genomischer Bibliothek isoliert. Die 1,3 kb J-Region wird ersetzt durch das 1,1 kb Insert aus pMCIneo. Das HSV-TK-Gen wird dann an das 5'-Ende des KpnI-Fragments hinzugefügt. Die korrekte Integration dieses Konstrukts durch homologe Rekombination hat den Austausch der Maus-J<sub>H</sub>-Region durch das neo-Gen zur Folge (Fig. 7). Rekombinanten werden gescreent durch PCR mit einem Primers gegen das neo-Gen und ein Primer homolog zu Maus-Sequenzen 5' von der KpnI-Stelle in der D-Region.

Alternativ wird der schwere Kette-Locus ausgeknockt durch Zerstören der codierenden Region des  $\mu$ -Gens. Dieser Ansatz umfaßt das gleiche 15 kb KpnI-Fragment, das im vorherigen Ansatz verwendet wurde. Das 1,1 kb Insert aus pMCIneo wird inseriert in eine einzige BamHI-Stelle in Exon II und das HSV-TK-Gen wird an das 3'-KpnI-Ende hinzugefügt. Es wird dann nach Doppel-Crossover-Ereignissen auf jeder Seite des neo-Inserts selektiert, die das TK-Gen eliminieren. Diese werden nachgewiesen aus Pools von selektierten Klonen durch PCR-Amplifikation. Einer der PCR-Primer ist abgeleitet von neo-Sequenzen, der andere von Maus-Sequenzen außerhalb des Targeting-Vektors. Das funktionelle Zerstören der Maus-Immunglobulin-Loci ist in den Beispielen erläutert.

**Non-humane transgene Tiere mit  
rearrangierten Immunglobulin schweren und leichten Transgenen**

Den vorstehend beschriebenen transgenen Tieren mit nicht-rearrangierten Mini-Locus-Ig-  
 5 Transgenen liegt die Hypothese zugrunde, daß es möglich ist, ein vollständiges Antikörper-  
 Repertoire herzustellen, ohne sämtliche variablen Gensegmente, die im natürlichen Immun-  
 globulin-Locus gefunden werden, einzuschließen. Theoretisch ist es möglich, die Zahl unter-  
 schiedlicher Sequenzen zu reduzieren, die zum Primärrepertoire beitragen, ohne das Sekun-  
 därrepertoire zu reduzieren. Solange es genügend Diversität im Primärrepertoire gibt, um eine  
 10 T-Zell-abhängige Antwort für irgendein gegebenes Antigen auszulösen, sollte die somatische  
 Hypermutation in der Lage sein, einen hochaffinen Antikörper gegen das Antigen zu liefern.

Dieses Konzept wird fortgeführt, wenn ein vollständig heterologes Antikörper-Repertoire  
 ganz durch somatische Mutation erzeugt wird. Die Antigen-Verbindungsstelle wird erzeugt  
 15 durch die Grenze zwischen der amino-terminalen schweren Kette-Domäne und der amino-  
 terminalen leichten Kette-Domäne. Die CDR1-, 2- und 3-Reste in jeder dieser Domänen, die  
 mit dem Antigen wechselwirken, liegen auf drei verschiedenen Schleifen, die  $\beta$ -Stränge  
 (Faltblätter) verbinden. Wie vorstehend beschrieben haben diese Regionen die größte  
 Sequenz-Diversität zwischen verschiedenen Antikörpermolekülen, die verschiedene Antigene  
 20 erkennen. So wird das Antikörper-Repertoire bestimmt durch die Sequenz-Diversität an  
 CDR1, 2 und 3. Die Diversität an CDR1, 2 und 3 für ein vollständiges Antikörper-Repertoire  
 entsteht aus drei Quellen: Rekombinationsdiversität, Verbindungsdiversität und somatische  
 Mutation. Rekombinationsdiversität an CDR1 und 2 entsteht aus der Wahl verschiedener V-  
 Segmente mit verschiedenen CDR1- und 2-Sequenzen. Rekombinationsdiversität an CDR3  
 25 entsteht aus der Wahl verschiedener D- und J-Segmente. Verbindungsdiversität trägt nur zu  
 der CDR3-Diversität bei. Somatische Mutation, die über die gesamte V-Region wirkt, trägt  
 zur Diversität aller drei Komplementaritäts-bestimmender Regionen bei. Rekombinations-  
 und Verbindungsdiversität zusammen bilden die Diversität des Primärrepertoires (Fig. 1). So  
 erzeugt die VDJ-Verbindung eine Gruppe IgM-exprimierender primärer B-Zellen.

30 Jede Primärrepertoire-B-Zelle, die ein Zelloberflächen-IgM-Molekül mit einer bestimmten  
 minimalen Affinität für ein Fremdanigen exprimiert, internalisiert dieses Antigen als IgM



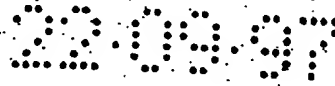
und zyklisieren weg von der Zelloberfläche. Das Antigen wird dann prozessiert und assoziierte Peptide werden präsentiert auf der Zelloberfläche durch MHC Klasse II-Moleküle. Wenn genügend Fremdantigen an der Zelloberfläche präsentiert wird, löst dies eine T-Zell-Antwort aus, die umgekehrt die T-Zell-abhängige Reifung der B-Zelle auslöst. Dies ist die sogenannte Sekundärantwort (Fig. 8). Teil dieser Antwort umfaßt die Hypermutation des variablen Teils der Immunglobuline. So ergibt ein B-Zell-Klon, der eine Sekundärantwort erfahren hat, beständig neue Klone mit veränderten Immunglobulin-Molekülen. Diese Klone mit höheren Affinitäten für das Fremdantigen werden selektiv expandiert durch Helfer-T-Zellen, woraus Affinitätsreifung des exprimierten Antikörpers entsteht. Aufgrund der über die gesamte V-Region stattfindenden somatischen Hypermutationen gibt es keine theoretische Grenze für den Vorgang der Affinitätsreifung.

CDR1- und 2-Diversität ist nicht notwendig zum Herstellen einer vollständigen Antikörper-Antwort. Vielmehr stellt die Diversität an CDR3 erzeugt durch VJ- und VDJ-Verbindung genügend minimale Affinität bereit, um die T-Zell-abhängige Reifung auszulösen zum Entstehen hochaffiner Antikörper für eine große Zahl unterschiedlicher Antigene. So können Verfahren und transgene Tiere bereitgestellt werden zum Erzeugen eines breiten Antikörper-Repertoires ohne primäre Diversität. Solche Diversität beruht auf somatischer Mutation für die Erzeugung der Antikörper-Diversität. Während des Vorgangs der Affinitätsreifung entsteht aus der somatischen Mutation eine große Zahl von Klonen mit geringerer, eher als höherer, Affinitäten für das stimulierende Antigen. Die meisten der Klone werden nicht selektiert und sterben. Wenn jedoch einer dieser Klone eine Affinität für ein neues Antigen hat, das auch vorhanden ist, expandiert dieser Klon und macht Affinitätsreifung für das Antigen durch (Fig. 9). So ergibt sich, wenn ein non-humanes transgenes Tier, wie eine Maus, mit rearrangierten humanen schwere und leichte Ketten, die kombinieren zur Bildung eines Antikörpers mit einer geringen Affinität für ein bekanntes Antigen injiziert wird mit dem bekannten Antigen, machen seine B-Zellen eine Sekundär-Antwort durch, was zur Produktion von hochaffinen Antikörpern für dieses Antigen führt. Wenn diese Maus jedoch zuerst injiziert wird mit einer Mischung des bekannten Antigens und einem neuen Antigen und dann nachfolgend immunisiert wird mit dem neuen Antigen allein, werden hochaffine Antikörper gegen das neue Antigen hergestellt durch den vorstehend beschriebenen Verzweigungsvorgang. Dieser Ansatz hat zwei Hauptvorteile: Erstens, die Transgen-Konstrukte sind einfach herzustellen;

und zweitens sind die rearrangierten Transgene in der Lage, allelisch und isotypisch das Rearrangement der endogenen Mausgene auszuschließen. Somit ist es nicht erforderlich, diese Gene durch homologe Rekombination zu beseitigen, wie vorstehend beschrieben.

- 5 Der erste Schritt ist die Isolierung von rearrangierten schwere und leichte Kette-Genen aus einem menschlichen Hybridom, das einen IgM-Antikörper, gerichtet gegen ein bekanntes Antigen, exprimiert. Das ideale Hybridom erkennt ein leicht verfügbares Antigen, das in der Lage ist, eine gute Maus-T-Zellantwort zu erzeugen. Es gibt eine Anzahl solcher humaner Hybridoma einschließlich mehrerer, die mit wichtigen Antigenen, wie Tetanus-Toxoid, Pseudomonas oder Gram-negativen Bakterien reagieren (Übersichtsartikel von James und Bourla, 10 1987, J. Immunol. Methods, 100, 5-40). Das gesamte rearrangierte schwere Kette-Gen wird isoliert auf einem einzigen Stück DNA (etwa 20 kb), während das rearrangierte  $\kappa$ -leichte Kette-Gen einschließlich des 3'-Enhancers isoliert wird auf einem zweiten DNA-Fragment (etwa 20 kb). Jedes dieser Fragmente wird stückweise zusammengesetzt aus Klonen, isoliert 15 aus einer  $\lambda$ -Phagen-Bibliothek, hergestellt aus DNA, isoliert von dem Hybridom. Zwei Konstrukte werden erzeugt, ein schwere Kette-Konstrukt und ein leichte Kette-Konstrukt.

- Das schwere Kette-Konstrukt (Fig. 10) besteht aus dem 20 kb Hybridom-Fragment mit dem rearrangierten IgM-Gen, ligiert an ein 25 kb Fragment, das die humanen  $\gamma 3$  und  $\gamma 1$ -konstanten 20 Regionen enthält, gefolgt von einem 700 bp Fragment mit dem Ratte-schwere Kette-3'-Enhancer (Pettersson et al., 1990, Nature, 344, 165-168). Das leichte Kette-Konstrukt besteht aus dem intakten 20 kb Stück DNA mit der rearrangierten  $\kappa$ -Kette und dem 3'-Enhancer. Diese beiden Konstrukte werden koinjiziert, so daß sie in eine einzige Stelle des Maus-Genoms integrieren. Transgene Mäuse werden getestet durch Northern-Blot-Untersuchung 25 auf Expression der transgenen mRNA. FACS-Analyse wird dann durchgeführt an Schwanzblut-Proben zum Nachweis der Zelloberflächen-Expression des Transgen-codierten Proteins. Mäuse werden dann immunisiert mit dem Antigen erkannt von dem ursprünglichen Hybridom. ELISA- und FACS-Analyse werden ausgeführt an Schwanzblut, um den Klassenwechsel nachzuweisen. Schließlich werden die Mäuse getestet auf ihre Fähigkeit, auf eine Anzahl 30 unterschiedlicher Antigene zu antworten durch Koinjektion einer Reihe an Antigenen zusammen mit dem ursprünglichen Antigen. Schwanzblut wird analysiert durch ELISA zum



Nachweis der Herstellung hochaffiner humaner IgG-Antikörper gerichtet gegen einzelne Antigene.

5 Zur Verwendung dieser transgenen Maus zum Erzeugen humaner Antikörper gerichtet gegen ein gegebenes Antigen wird das Antigen zunächst koinjiziert zusammen mit dem Antigen erkannt von dem Hybridom, aus dem die Gene isoliert wurden. Dieses Hybridom-assoziierte Antigen wird als das Ko-Antigen bezeichnet (manchmal als zweites Antigen) und das neue Antigen einfach als das Antigen (oder das erste Antigen). Wenn möglich wird das zweite Antigen chemisch kreuzvernetzt mit dem ersten Antigen vor der Injektion. Dies bewirkt, daß 10 das erste Antigen internalisiert und präsentiert wird von den Primärtransgen-präsentierenden B-Zellen. Dies sichert die Existenz eines Pools an aktivierten Helfer-T-Zellen, die das erste Antigen erkennen. Ein typisches Immunisierungsschema ist wie folgt: Tag 1: die Mäuse werden i.p. injiziert mit erstem Antigen gemischt mit oder vernetzt zu dem zweiten Antigen in komplettem Freundschens Adjuvans, Tag 14: das erste Antigen (ohne zweites Antigen) wird 15 i.p. injiziert in inkomplettem Freundschens Adjuvans. Tag 35: Wiederholung der Injektion mit erstem Antigen in inkomplettem Freundschens Adjuvans. Tag 45: Untersuchung auf Antikörper-Antwort durch ELISA an Schwanzblutproben. Tag 56: Wiederholung der Injektion von guten Respondern mit Antigenen in inkomplettem Freundschens Adjuvans. Tag 59: Fusion der Milz (Zellen von guten Respondern).

20

Alternativ wird das Antigen erkannt von dem Hybridoma, aus dem die Ig-Gene isoliert wurden, verwendet als Immunogen. Neue transgene Hybridoma werden dann isoliert aus dem immunisierten Tier, das somatisch mutierte Versionen des ursprünglichen Antikörpers exprimiert. Diese neuen Antikörper werden eine höhere Affinität für das ursprüngliche Antigen haben. Dieser Antikörper-"Schärfungs"-Vorgang kann auch auf Antikörper-Gene, erzeugt 25 durch CDR-Übertragung (EP-A-0-239 400, veröffentlicht am 30. September 1987) oder isoliert aus bakteriellen (W.D. Huse et al., 1989, Science, 246, 1275) oder Phagen- (T. Clackson et al., 1991, Nature, 352, 624) Expressions-Bibliotheken.

Non-humane transgene Tiere mit rearrangiertem und  
nicht-rearrangiertem Immunglobulin schweres und/oder leichtes Transgen

5 Vorstehend wurde beschrieben die Verwendung von vollständig rearrangierten oder vollständig nicht-rearrangierten schwere und leichte Immunglobulin-Transgenen zum Herstellen non-humaner transgener Tiere, die in der Lage sind, einen heterologen Antikörper zu bilden.

10 Transgene Tiere mit mindestens einem rearrangierten und mindestens einem nicht-rearrangierten Immunglobulin-Transgen, werden hergestellt durch Verwendung irgendeines der vorgenannten nicht-rearrangierten und rearrangierten Transgene in Verbindung zum Bereitstellen schwerer und leichter Transgene im transgenen Tier. In dieser Hinsicht kann das nicht-rearrangierte Transgen umfassen ein schweres oder leichtes genomisches oder Mini-Locus-Transgen-Konstrukt mit dem rearrangierten Transgen umfassend ein geeignetes rearrangiertes Transgen. Wenn beispielsweise ein nicht-rearrangiertes Mini-Locus leichte Kette-Transgen  
15 verwendet wird, ist das geeignete andere Transgen ein vollständig rearrangiertes schwere Kette-Transgen. Es ist jedoch bevorzugt, daß das rearrangierte Transgen ein rearrangiertes Immunglobulin leichte Kette-Transgen umfaßt und daß das nicht-rearrangierte Transgen ein Immunglobulin schwere Kette-genomisches oder Mini-Locus-Transgen umfaßt, insbesondere ein nicht-rearrangiertes schwere Kette-Transgen mit assoziierten- A und Y-konstante Regionen.  
20

Die Kombination von rearrangierten und nicht-rearrangierten Transgenen stellt bereit ein mittleres Maß an Diversität in den Primärrepertoire-B-Zellen. So, obwohl die primäre Diversität an CDR1, CDR2 und CDR3 in dem rearrangierten Transgen fixiert ist in der Primärrepertoire-B-Zelle, stellt die primäre Diversität an CDR1, CDR2 und CDR3 hergestellt durch  
25 Rearrangement des nicht-rearrangierten Transgens eine Population des Primärrepertoires von B-Zellen bereit mit größerer potentieller Diversität als der B-Zell-Klon, erhalten durch Verwendung von rearrangierten schwere und leichte Transgenen. Solche primäre Diversität stellt eine verbreiterte sekundäre Diversität bereit, wenn solche Zellen auf Fremdartigene antworten mittels somatischer Mutation.  
30

### Nucleinsäuren

5 In Zusammenhang mit Nucleinsäuren gibt der Begriff "im wesentlichen Homologie" an, daß zwei Nucleinsäuren oder bestimmte Sequenzen davon bei optimaler Aneinanderreihung (aligned) und verglichen, identisch sind, mit geeigneten Nucleotid-Insertionen oder Deletionen bei mindestens etwa 80% der Nucleotide, vorzugsweise mindestens etwa 90% bis 95% und insbesondere mindestens etwa 98 bis 99,5% der Nucleotide. Alternativ liegt im wesentlichen Homologie vor, wenn die Segmente hybridisieren unter selektiven Hybridisierungsbedingungen zum Gegenstrang. Die Nucleinsäuren können in ganzen Zellen vorhanden sein, in einem Zelllysate oder in einer teilweise aufgereinigten oder im wesentlichen reinen Form. Eine Nucleinsäure ist "isoliert" oder "im wesentlichen aufgereinigt", wenn andere zelluläre Komponenten oder andere Verunreinigungen abgetrennt sind, z.B. andere zelluläre Nucleinsäuren oder Proteine durch Standardverfahren einschließlich Alkali/SDS-Behandlung, CsCl-Dichtegradientenzentrifugation, Säulenchromatographie, Agarosegelelektrophorese und andere bekannte Verfahren; vgl. F. Ausubel et al., Herausgeber, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987.

20 Die Nucleinsäurezusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können, die häufig als native Sequenz vorliegen (ausgenommen modifizierte Restriktionsstellen und dergleichen) entweder cDNA, genomische DNA oder Gemische davon mutiert sein in Übereinstimmung mit Standardverfahren zum Bereitstellen von Gensequenzen. Für codierende Sequenzen können diese Mutationen die gewünschte Aminosäuresequenz beeinflussen. Insbesondere kommen DNA-Sequenzen in Betracht, die im wesentlichen homolog sind zu oder abgeleitet von nativen V-, D-, J-, konstanten, Klassenwechsel- und anderen solchen Sequenzen, die hier beschrieben sind. Der Ausdruck zeigt an, daß eine Sequenz identisch oder modifiziert von einer anderen Sequenz ist.

30 Eine Nucleinsäure ist "in operativer Weise verbunden", wenn sie in funktionelle Beziehung zu einer anderen Nucleinsäuresequenz gesetzt wird. Beispielsweise ist ein Promotor oder Enhancer in operativer Weise verbunden mit einer codierenden Sequenz, wenn er die Transkription der Sequenz beeinflußt. Im Hinblick auf Transkriptions-regulatorische Sequenzen bedeutet in operativer Weise verbunden, daß die verbundenen DNA-Sequenzen aneinander-



grenzend und, wo notwendig, zwei Protein-codierende Regionen verbunden sind, aneinander grenzend und im Leseraster. Für Klassenwechsel-Sequenzen zeigt in operativer Weise verbunden an, daß die Sequenzen in der Lage sind, die Klassenwechsel-Rekombination zu bewirken.

5

Im nachfolgenden und in den Beispielen versteht es sich nochmals, daß in dem Maß, daß Material nicht in direktem Zusammenhang steht mit den angehängten Ansprüchen, dieses zur Erläuterung dient.

10

#### Speziell bevorzugte Ausführungsformen

15

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist ein Tier mit einer einzelnen Kopie eines Transgens, beschrieben in Beispiel 14 (pHC2), gezüchtet mit einem Tier mit einer einzelnen Kopie des Transgens beschrieben in Beispiel 16 und der Nachkomme gezüchtet mit dem JH-deletierten Tier beschrieben in den Beispielen 9 und 12. Die Tiere werden zur Homozygotie gezüchtet für jede dieser drei Eigenschaften. Solche Tiere haben den folgenden Genotyp: eine einzelne Kopie (pro Haplotyp-Chromosomen) eines menschliche schwere Kette-nicht-rearrangierten Mini-Locus (beschrieben in Beispiel 14), eine einzelne Kopie (pro Haplotyp von Chromosomen) eines rearrangierten humane  $\kappa$ -leichte Kette-Konstrukts (beschrieben in Beispiel 16) und eine Deletion an jedem endogenen Maus-schwere Kette-Locus, die alle funktionellen JH-Segmente beseitigt (beschrieben in Beispielen 9 und 12). Solche Tiere werden gezüchtet mit Mäusen, die homozygot sind für die Deletion der JH-Segmente (Beispiele 9 und 12) um Nachkommenschaft hervorzubringen, die homozygot ist für die JH-Deletion und hemizygot für die humanen schwere und leichte Kette-Konstrukte. Die resultierenden Tiere werden immunisiert mit Antigenen und verwendet zur Herstellung von humanen monoklonalen Antikörper gegen diese Antigene.

25

B-Zellen isoliert aus solch einem Tier sind monospezifisch im Hinblick auf die humanen schwere und leichte Ketten, da sie nur eine einzelne Kopie jedes Gens enthalten. Weiterhin werden sie monospezifisch sein im Hinblick auf humane oder Maus-schwere Ketten, da beide endogenen Maus-schwere Kette-Genkopien nicht funktionell sind aufgrund der Deletion, die die JH-Region überspannt, die gemäß Beispielen 9 und 12 eingeführt wird. Weiterhin wird

30

ein wesentlicher Teil der B-Zellen monospezifisch sein im Hinblick auf humane oder Maus-leichte Ketten, da die Expression der einzelnen Kopie des rearrangierten humane  $\kappa$ -leichte Kette-Gens allelisch und isotypisch ausschließt das Rearrangement der endogenen Maus  $\kappa$ - und  $\lambda$ -Kette-Gene an einem bedeutenden Teil der B-Zellen.

5

Die bevorzugte transgene Maus wird Immunglobulin-Produktion mit einem signifikanten Repertoire zeigen, idealerweise im wesentlichen ähnlich zu derjenigen der nativen Maus. Wenn beispielsweise die endogenen Ig-Gene inaktiviert worden sind, so beträgt der Gesamt-Immunglobulin-Spiegel etwa 0,1 bis 10 mg/ml Serum, vorzugsweise 0,5 bis 5 mg/ml, idealerweise mindestens etwa 1,0 mg/ml. Wenn ein zum Bewirken eines Klassenwechsels nach IgG von IgM fähiges Transgen in die transgene Maus eingeführt worden ist, beträgt das Verhältnis von Serum IgG zu IgM in der adulten Maus vorzugsweise etwa 10:1. Natürlich beträgt das IgG- zu IgM-Verhältnis in der nicht ausgewachsenen Maus viel weniger. Im allgemeinen größer als etwa 2%, vorzugsweise 40 bis 80% der Milz und Lymphknoten-B-Zellen exprimieren ausschließlich humanes IgG-Protein.

15

Das Repertoire wird idealerweise sich dem in einer non-transgenen Maus gezeigten annähern, gewöhnlich mindestens etwa 10%, vorzugsweise mindestens 25 bis 50% oder mehr. Im allgemeinen werden mindestens etwa 1000 verschiedene Immunglobuline (idealweise IgG), vorzugsweise  $10^4$  bis  $10^6$  oder mehr, produziert abhängig in erster Linie von der Zahl verschiedener V-, J- und D-Regionen eingeführt in das Mausgenom. Diese Immunglobuline werden typischerweise etwa die Hälfte oder mehr der hochantigenen Proteine erkennen einschließlich, aber nicht begrenzt auf: Tauben-Cytochrom C, Hühner-Lysozym, Pokeweed-Mitogen (Lektine aus *Phytolacca americana*), Rinderserumalbumin, Schlüssellochnapf-schnecken-Hämocyanin (KLH), Influenza-Hämagglutinin, *Staphylococcus*-Protein A, Spermin-Myoglobin, Influenza neuraminidase und Lambda-Repressor-Protein. Einige der Immunglobuline werden eine Affinität von mindestens etwa  $10^{-7}M^{-1}$ , vorzugsweise  $10^{-8}M^{-1}$  bis  $10^{-9}M^{-1}$  oder größer für vorausgewähltes Antigen zeigen.

20

25

30

Obwohl vorstehend ein bevorzugtes transgenes Tier beschrieben ist, sind andere Tiere hier beschrieben und spezieller definiert durch die Transgene beschrieben in den Beispielen. Es können vier Kategorien von transgenem Tier definiert werden:

I. Transgene Tiere mit einem nicht-rearrangierten schwere und rearrangierten leichte Immunglobulin-Transgen.

5 II. Transgene Tiere mit einem nicht-rearrangierten schwere und nicht-rearrangierten leichte Immunglobulin-Transgen.

III. Transgene Tiere mit rearrangierten schwere und einem nicht-rearrangierten leichte Immunglobulin-Transgen, und

10

IV. Transgene Tiere mit rearrangierten schwere und rearrangierten leichte Immunglobulin-Transgenen.

Von diesen Kategorien des transgenen Tieres ist die bevorzugte Reihenfolge: I>II>III>IV.

15

Innerhalb dieser Kategorien des transgenen Tieres wird eine Anzahl möglicher Kombinationen bevorzugt. Solche bevorzugten Ausführungsformen umfassen die folgenden:

#### Kategorie I

20

- (a) Beispiel 1 und 2 oder 19 und 20 Tier gezüchtet mit Beispiel 7 oder 16 Tier.
  - (b) Beispiel 1 oder 19 Fragment koinjiziert mit Beispiel 7 oder 16 Fragment.
  - (c) Beispiel 5 (H, I oder J) oder 14, 17 oder 21 Tier gezüchtet mit Beispiel 7 oder 16 Tier.
  - (d) Beispiel 5 (H) oder 14 Konstrukt koinjiziert mit Beispiel 7 oder 16 Konstrukt.
  - 25 (e) Jedes der vorstehenden gezüchtet mit dem Tier aus Beispiel 9 oder 11, 12 oder 13.
- Besonders bevorzugte Ausführungsformen sind jedes der vorstehenden gezüchtet mit dem Tier aus Beispiel 9 oder 12 oder 13.

#### Kategorie II

30

- (a) Beispiel 1, 2, 19 oder 20 Tier gezüchtet mit Beispiel 6, 3, 4, 16, 22 oder 23 Tier.
- (b) Fragment in Beispiel 1 oder 19 koinjiziert mit Fragment in Beispiel 2 oder 20.



- (c) Beispiel 5 (H, I oder J) oder 14, 17 oder 21 Tier gezüchtet mit Beispiel 6 (B, C oder D) oder 16 Tier.
- (d) Konstrukt 5 (H) oder 14 koinjiziert mit Konstrukt 6 (B) oder 16.
- (e) Tier von Beispiel 1, 2, 19 oder 20 gezüchtet mit Tier von Beispiel 6 (B, C oder D) oder 16.
- (f) Tier von Beispiel 3, 4, 22 oder 23 gezüchtet mit Tier von Beispiel 5 (H, I oder J) oder 14, 17 oder 21.
- (g) Jedes der vorstehend genannten gezüchtet mit Tier von Beispiel 9, 10, 11, 12 oder 13.

10

Kategorie III

- (a) Beispiel 3, 4, 22 oder 23 Tier gezüchtet mit Beispiel 8 oder 15 Tier.
- (b) Beispiel 3 oder 23 Fragment koinjiziert mit Beispiel 8 oder 15 Fragment.
- (c) Beispiel 6 (B, C oder D) oder 16 Tier gezüchtet mit Beispiel 8 oder 15 Tier.
- (d) Beispiel 6 (B) oder 15 Konstrukt koinjiziert mit Beispiel 8 oder 15 Konstrukt.
- (e) Jedes der vorstehend gezüchtet mit Tier von Beispiel 9 bis 13.

15

Kategorie IV

- (a) Tier von Beispiel 7 oder 16, gezüchtet mit Tier von Beispiel 8 oder 15.
- (b) Konstrukt von Beispiel 7 oder 16 koinjiziert mit Konstrukt von Beispiel 8 oder 15.
- (c) Jedes der vorstehend gezüchtet mit Tier von Beispiel 9 bis 13.

20

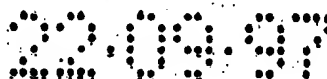
MATERIAL UND METHODEN

25

Transgene Mäuse werden abgeleitet gemäß Hogan et al., "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory.

Embryonale Stammzellen werden manipuliert gemäß veröffentlichten Verfahren (Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach, E.J. Robertson, Herausgeber, IRL-Press, Washington, D.C., 1987; Zijlstra et al., 1989, Nature, 342, 435-438 und Schwartzberg P. et al., 1989, Science, 246, 799-803).

30



DNA-Klonierungsverfahren werden ausgeführt gemäß J. Sambrook et al., in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

5

Oligonucleotide werden synthetisiert auf einem Applied Biosystems-Oligonucleotid-Synthesizer gemäß Anleitung bereitgestellt vom Hersteller.

10

Hybridoma-Zellen und Antikörper werden manipuliert gemäß "Antibodies: A Laboratory Manual", Ed Harlow und David Lane, Herausgeber, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

### BEISPIEL 1

#### Genomisches schwere Kette Human- $\gamma$ -Transgen

15

Dieses Beispiel beschreibt die Klonierung und Mikroinjektion eines humanen genomische schwere Kette-Immunglobulin-Transgens, das mikroinjiziert wird in eine Maus-Zygote. Kerne werden isoliert aus frischem menschlichen Plazentagewebe gemäß Marzluff W.F. et al., 1985, "Transcription and Translation: A Practical Approach", B.D. Hammes und S.J. Higgins, Herausgeber, Seiten 89-129, IRL Press, Oxford). Die isolierten Kerne (oder PBS-gewaschene menschliche Spermien) werden eingebettet in eine niedrig-schmelzende Agarosematrix und lysiert mit EDTA und Proteinase K zum Freisetzen von DNA hohen Molekulargewichts, die dann in der Agarose mit Restriktionsenzym NotI verdaut wird gemäß M. Finney in *Current Protocols in Molecular Biology* (F. Ausubel et al., Herausgeber John Wiley & Sons, Supp. 4, 1988, Section 2.5.1).

20

25

Die NotI-verdaute DNA wird dann fraktioniert durch Wechselfeldgelelektrophorese wie beschrieben bei Anand R. et al., 1989, *Nucl. Acids Res.*, 17, 3425-3433. NotI-Fragment angereicherte Fraktionen werden untersucht durch Southern-Hybridisierung zum Nachweise einer oder mehrerer der Sequenzen codiert von diesem Fragment. Solche Sequenzen schließen ein die schwere Kette-D-Segmente, J-Segmente  $\mu$ - und  $\gamma$ 1-konstante Region zusammen mit Vertretern aller 6 VH-Familien (obwohl dieses Fragment identifiziert wird als 670 kb Fragment aus HeLa-Zellen von Berman et al., 1988, *supra*, haben wir es als 830 kb Fragment gefunden

30



aus menschlicher Plazenta und Spermien-DNA). Dieses das NotI-Fragment enthaltenden Fraktionen (vgl. Fig. 4) werden vereinigt und kloniert in die NotI-Stelle des Vektors pYACNN in Hefezellen. Plasmid pYACNN wird hergestellt durch Verdau von pYAC-4 Neo (Cook H. et al., 1988, Nucleic Acids Res., 16, 11817) mit EcoRI und Ligation in Gegenwart des Oligonucleotids 5'-AAT TGC GGC CGC-3'.

YAC-Klone mit dem schwere Kette-NotI-Fragment werden isoliert gemäß Brownstein et al., 1989, Science, 244, 1348-1351 und Green, E. et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1213-1217. Das klonierte NotI-Insert wird isoliert Hefe-DNA hohen Molekulargewichts durch Weichselfeldgelelektrophorese gemäß M. Finney, *supra*. Die DNA wird kondensiert durch Hinzufügen von 1 mM Spermin und direkt mikroinjiziert in den Kern einzelliger Embryos wie vorstehend beschrieben.

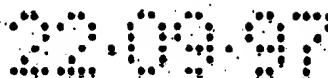
## BEISPIEL 2

### Diskontinuierliches genomisches schwere Kette-Ig-Transgen

Ein 110 kb SpeI-Fragment von menschlicher genomischer DNA mit VH6, D-Segmenten, J-Segmenten, der  $\mu$ -konstanten Region und einem Teil der  $\gamma$ -konstanten Region (vgl. Fig. 4) wird isoliert durch YAC-Klonierung wie beschrieben in Beispiel 1.

Ein 570 kb NotI-Fragment stromaufwärts von dem vorstehend beschriebenen 670-830 kb NotI-Fragment mit mehrfachen Kopien von VI bis V5 wird isoliert wie beschrieben. (Berman et al., 1988, *supra*, wiesen zwei 570 kb NotI-Fragmente nach. Jedes von diesen enthält mehrfache V-Segmente).

Die zwei Fragmente werden koinjiziert in den Kern eines einzelligen Mausembryos wie beschrieben in Beispiel 1. Koinjektion zweier verschiedener DNA-Fragmente führt gewöhnlich zur Integration beider Fragmente führen an der gleichen Insertionsstelle innerhalb des Chromosoms. Deswegen werden etwa 50% der resultierenden transgenen Tiere, die mindestens eine Kopie jedes der beiden Fragmente enthalten, das V-Fragment stromaufwärts inseriert haben von dem konstante Region-enthaltenden Fragment. Von diesen Tieren werden 50% V mit DJ-Verbindung durchführen durch DNA-Inversion und 50% durch Deletion



abhängig von der Orientierung des 570 kb NotI-Fragments relativ zur Position des 110 kb SpeI-Fragments. DNA wird isoliert aus den resultierenden transgenen Tieren und diese Tiere, von denen durch Southern-Blot-Hybridisierung gefunden wurde, daß sie beide Transgene enthalten, speziell, diese Tiere, mit sowohl mehrfachen humanen V-Segmenten als auch humanen konstante Region-Genen) werden untersucht auf ihre Fähigkeit, humane Immunglobulin-Moleküle zu exprimieren.

### BEISPIEL 3

Genomisches  $\kappa$ -leichte Kette humanes Ig-Transgen  
gebildet durch *in vivo* homologe Rekombination

Eine Karte der humanen  $\kappa$ -leichten Kette ist beschrieben worden in Lorenz W. et al., 1987, Nucl. Acids Res., 15, 9667-9677, und ist in Fig. 11 gezeigt.

Ein 450 kb XhoI bis NotI-Fragment, das alle C $\kappa$ , den 3'-Enhancer, alle J-Segmente und mindestens 5 verschiedene V-Segmente einschließt (a) wird isoliert und mikroinjiziert in den Kern eines einzelligen Embryos wie beschrieben in Beispiel 1.

### BEISPIEL 4

Genomisches  $\kappa$ -leichte Kette humanes Ig-Transgen  
gebildet durch *in vivo* homologe Rekombination

Ein 750 kb MluI bis NotI-Fragment, das alle vorhergehenden und weiterhin mindestens 20 weitere V-Segmente (b) umfaßt, wird isoliert wie beschrieben in Beispiel 1 (vgl. Fig. 11) und verdaut mit BssHII zur Herstellung eines Fragments von etwa 400 kb (c).

Das 450 kb XhoI bis NotI-Fragment (a) und zusätzlich das ungefähr 400 kb MluI bis BssHII-Fragment (c) haben Sequenzüberlappung definiert durch die BssHII- und XhoI- Restriktionsstellen gezeigt in Fig. 11. Homologe Rekombination dieser beiden Fragmente nach Mikroinjektion in eine Mauszygote führt zu einem Transgen mit mindestens 15 bis 20 weiteren V-Segmente im Vergleich zu denjenigen im 450 kb XhoI/NotI-Fragment (Beispiel 3).



# BEISPIEL 5

## Konstruktion des schweren Kette-Mini-Locus

### A. Konstruktion von pGP1 und pGP2

5

pBR322 wird verdaut mit EcoRI und StyI und ligiert mit den folgenden Oligonucleotiden zur Herstellung von pGP1, das ein 147-Basenpaar Insert enthält mit der in Fig. 13 gezeigten Restriktionsstelle. Die allgemeine Überlappung dieser Oligos ist auch in Fig. 13 gezeigt.

10 Die Oligonucleotide sind:

Oligo-1 5'- CTT GAG CCC GCC TAA TGA GCG GGC TTT TTT TTG CAT ACT GCG  
GCC -3'

15 Oligo-2 5'- GCA ATG GCC TGG ATC CAT GGC GCG CTA GCA TCG ATA TCT AGA  
GCT CGA GCA -3'

Oligo-3 5'- TGC AGA TCT GAA TTC CCG GGT ACC AAG CTT ACG CGT ACT AGT  
GCG GCC GCT -3'

20

Oligo-4 5'- AAT TAG CGG CCG CAC TAG TAC GCG TAA GCT TGG TAC CCG GGA  
ATT -3'

25

Oligo-5 5'- CAG ATC TGC ATG CTC GAG CTC TAG ATA TCG ATG CTA GCG CGC  
CAT GGA TCC -3'

Oligo-6 5'- AGG CCA TTG CGG CCG CAG TAT GCA AAA AAA AGC CCG CTC ATT  
AGG CGG GCT -3'

30

Dieses Plasmid enthält einen großen Polylinker flankiert von selten schneidenden NotI-Stellen zum Aufbau großer Inserts, die isoliert werden können aus Vektorsequenzen zur Mikroin-

jektion. Das Plasmid basiert auf pBR322, welches in relativ geringer Kopienzahl vorliegt gegenüber dem pUC-basierenden Plasmid (pGP1 behält die pBR322-Kopienanzahl-Kontrollregion nahe dem Ursprung der Replikation). Die geringe Kopienzahl reduziert die potentielle Toxizität der Insert-Sequenzen. Zusätzlich enthält pGP1 eine starke Transkriptions-Terminatorsequenz abgeleitet von trpA (Christie G.E. et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA) inseriert zwischen das Ampicillin-Resistenzgen und den Polylinker. Dies vermindert weiterhin die Toxizität assoziiert mit bestimmten Inserts durch Verhindern der fortgesetzten Transkription durch die Ampicillin-Promotoren.

Plasmid pGP2 ist abgeleitet von pGP1 zur Einführung einer weiteren Restriktionsstelle (SfiI) in dem Polylinker. pGP1 wird verdaut mit MluI und SpeI zum Schneiden der Erkennungssequenzen im Polylinker-Teil des Plasmids.

Die folgenden Adaptor-Oligonucleotide werden ligiert mit dem so verdauten pGP1 zur Bildung von pGP2.

5' CGC GTG GCC GCA ATG GCC A 3'

5' CTA GTG GCC ATT GCG GCC A 3'

pGP2 ist identisch mit pGP1, jedoch enthält es eine zusätzliche SfiI-Stelle zwischen den MluI- und SpeI-Stellen. Dies erlaubt es, Inserts vollständig mit SfiI ebenso wie mit NotI herauszuschneiden.

#### B. Konstruktion von pRE3 (Ratten-Enhancer 3')

Eine Enhancer-Sequenz stromabwärts von der Ratten-konstanten Region wird integriert in die schwere Kette-Konstrukte.

Der schwere Kette-Region 3'-Enhancer beschrieben von S. Pettersson et al., 1990, Nature, 344, 165-168, wird isoliert und kloniert. Die Ratten-IgH 3'-Enhancer-Sequenz wird amplifiziert durch PCR mit folgenden Oligonucleotiden:

22.09.97

5' CAG GAT CCA GAT ATC AGT ACC TGA AAC AGG GCT TGC 3'  
 5' GAG CAT GCA CAG GAC CTG GAG CAC ACA CAG CCT TCC 3'

5 Die so gebildete doppelsträngige DNA, die den 3'-Enhancer codiert, wird geschnitten mit BamHI und SphI und in BamHI/SphI-geschnittenen pGP2 kloniert. Man erhält pRE3 (Ratten-Enhancer 3').

### C. Klonierung der Humanen J- $\mu$ -Region

10 Ein wesentlicher Teil dieser Region wird kloniert durch Kombinieren zweier oder mehrerer Fragmente isoliert aus  $\lambda$ -Phagen-Inserts; vgl. Fig. 14.

15 Ein 6,3 kb BamHI/HindIII-Fragment, das alle humanen J-Segmente (Matsuda et al., 1988, EMBO J., 7, 1047-1051; Ravetch et al., 1981, Cell, 27, 583-591) wird isoliert aus menschlicher genomischer DNA-Bibliothek unter Verwendung des Oligonucleotids GGA CTG TGT CCC TGT GTG ATG CTT TTG ATG TCT GGG GCC AAG.

20 Ein angrenzendes 10 kb HindIII/BamII-Fragment mit Enhancer, Klassenwechsel und konstante Region-codierende Exons (Yasui et al., 1989, Eur. J. Immunol., 19, 1399-1403) wird in ähnlicher Weise isoliert mit dem Oligonucleotid:

CAC CAA GTT GAC CTG CCT GGT CAC AGA CCT GAC CAC CTA TGA

25 Ein angrenzendes 3' 1,5 kb BamHI-Fragment wird in ähnlicher Weise isoliert mit dem Klon pMUM-Insert als Sonde (pMUM ist ein 4 kb EcoRI/HindIII-Fragment aus menschlicher genomischer DNA-Bibliothek mit Oligonucleotiden:

CCT GTG GAC CAC CGC CTC CAC CTT CAT  
 CGT CCT CTT CCT CCT

30

$\mu$  Membran Exon 1) und kloniert in pUC19.

pGP1 wird verdaut mit BamHI und BglII und sodann mit Kalbsdarm-alkalischer Phosphatase behandelt.

Fragmente (a) und (b) aus Fig. 14 werden kloniert in verdaulichem pGP1. Ein Klon wird dann isoliert, der so orientiert ist, daß die 5'-BamHI-Stelle zerstört wird durch BamHI/Bgl-Fusion. Er wird identifiziert als pMU (vgl. Fig. 15). pMU wird verdaut mit BamHI und Fragment (c) aus Fig. 14 wird inseriert. Die Orientierung wird überprüft durch HindIII-Verdau. Das resultierende Plasmid pHIG1 (Fig. 15) enthält ein 18 kb Insert, das die J- und C $\mu$ -Segmente codiert.

10

#### D. Klonierung der C $\mu$ -Region

pGP1 wird verdaut mit BamHI und HindIII und sodann mit Kalbsdarm-alkalischer Phosphatase behandelt (Fig. 14). Das so behandelte Fragment (b) von Fig. 14 und Fragment (c) von Fig. 14 werden kloniert in den BamHI/HindIII-geschnittenen pGP1. Korrekte Orientierung des Fragments (c) wird überprüft durch HindIII-Verdau unter Bildung von pCON1 mit einem 12 kb Insert, das die C $\mu$ -Region codiert.

20

Andererseits wird pHIG1, das J-Segmente, Klassenwechsel und  $\mu$ -Sequenzen in seinem 18 kb Insert mit einer SfiI 3'-Stelle und einer SpeI 5'-Stelle in einem Polylinker flankiert von NotI-Stellen enthält, verwendet für rearrangierte VDJ-Segmente. pCON1 ist identisch ausgenommen, jedoch fehlt ihm die J-Region und es enthält nur ein 12 kb Insert. Die Verwendung von pCON1 bei der Konstruktion des Fragments mit rearrangierten VDJ-Segmenten wird nachstehend beschrieben.

25

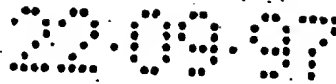
#### E. Klonierung von $\gamma$ -1 konstanter Region (pREG2)

Die Klonierung der menschlichen  $\gamma$ -1-Region ist dargestellt in Fig. 16.

30

Yamamura et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2152-2156, beschrieben die Expression von Membran-gebundenen humanen  $\gamma$ -1 von einem Transgen-Konstrukt, das bei der Integration teilweise deletiert worden war. Ihre Ergebnisse zeigen, daß die 3' BamHI-Stelle





eine Sequenz begrenzt, die die Transmembran rearrangierte und klassengewechselte Kopie des  $\gamma$ -Gens mit einem V-C-Intron von weniger als 5 kb umfaßt. Deswegen ist im nicht rearrangierten, nicht klassengewechselten Gen die gesamte Klassenwechsel-Region eingeschlossen in eine Sequenz beginnend weniger als 5 kb vom 5'-Ende des ersten  $\gamma$ -1 konstanten Exons. Deswegen ist sie eingeschlossen im 5' 5,3 kb HindIII-Fragment (Ellison J.W. et al., 1982, Nucleic Acids Res., 10, 4071-4079). Takahashi et al., 1982, Cell, 29, 671-679 berichten auch, daß dieses Fragment die Klassenwechselsequenz enthält. Dieses Fragment zusammen mit dem 7,7 kb HindIII bis BamHI-Fragment muß sämtliche Sequenzen einschließen, die für das transgene Konstrukt erforderlich sind.

Phagen-Klone mit der  $\gamma$ -1-Region werden identifiziert und isoliert mit folgendem Oligonucleotid, welches spezifisch ist für das dritte Exon von  $\gamma$ -1 (CH3).

5' TGA GCC ACG AAG ACC CTG AGG TCA AGT TCA ACT GGT ACG TGG 3'

Ein 7,7 kb HindIII bis BglII-Fragment (Fragment (a) in Fig. 16) wird kloniert in HindIII/BglII geschnittenen pRE3 unter Bildung von pREG1. Das stromaufwärts liegende 5,3 kb HindIII-Fragment (Fragment (b) in Fig. 16) wird kloniert in HindIII-verdautes pREG1 unter Bildung von pREG2. Korrekte Orientierung wird bestätigt durch BamHI/SpeI-Verdau.

#### F. Kombinieren von $C_\gamma$ und $C_\mu$

Das vorstehend beschriebene Plasmid pHIG1 enthält menschliche J-Segmente und die  $C_\mu$  konstante Region Exons. Zur Herstellung eines Transgens mit den  $C_\mu$  konstante Region-Gen-segmenten wurde pHIG1 mit SfiI verdaut (Fig. 15). Das Plasmid pREG2 wurde auch verdaut mit SfiI unter Bildung eines 13,5 kb Inserts mit menschlichen  $C_\gamma$ -Exons und der Ratten-3'-Enhancer-Sequenz. Diese Sequenzen wurden kombiniert unter Bildung des Plasmids pHIG3' (Fig. 17) mit den menschlichen J-Segmenten, der menschlichen  $C_\mu$  konstanten Region, der menschlichen  $C_\gamma$ -1 konstanten Region und dem Ratten-3'-Enhancer in einem 31,5 kb Insert.

Ein zweites Plasmid, das menschliches  $C_\mu$  und menschliches  $C_\gamma$ 1 ohne J-Segmente codiert, wird konstruiert durch Verdau von pCON1 mit SfiI und Kombinieren dessen mit dem SfiI-

Fragment mit der menschlichen C $\gamma$ 1-Region und dem Ratten-3'-Enhancer durch Verdau von pREG2 mit SfiI. Das resultierende Plasmid, pCON (Fig. 17) enthält ein 26 kb NotI/SpeI-Insert mit menschlichem C $\mu$ , menschlichem  $\gamma$ 1 und der Ratten-3'-Enhancer-Sequenz.

### 5 G. Klonierung von D-Segment

Die Strategie zur Klonierung von menschlichen D-Segmenten ist in Fig. 18 gezeigt. Phagen-Klone aus der menschlichen genomischen Bibliothek mit D-Segmenten werden identifiziert und isoliert mit Sondenmolekülen spezifisch für Diversitätsregion-Sequenzen (Y. Ichihara et al., 1988, EMBO J., 7, 4141-4150). Die folgenden Oligonucleotide werden verwendet:

DXP1: 5'- TGG TAT TAC TAT GGT TCG GGG AGT TAT TAT AAC CAC AGT GTC - 3'

DXP4: 5'- GCC TGA AAT GGA GCC TCA GGG CAC AGT GGG CAC GGA CAC TGT- 3'

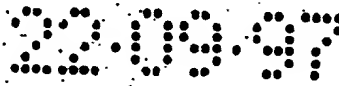
DN4: 5'- GCA GGG AGG ACA TGT TTA GGA TCT GAG GCC GCA CCT GAC ACC - 3'

Ein 5,2 kb XhoI-Fragment (Fragment (b) in Fig. 18) mit DLR1, DXP1, DXP'1 und DA1 wird isoliert aus einem Phagen-Klon, der mit Oligo DXP1 identifiziert wurde.

Ein 3,2 kb XbaI-Fragment (Fragment (c) in Fig. 18) mit DXP4, DA4 und DK4 wird isoliert aus einem Phagen-Klon, der mit Oligo DXP4 identifiziert wurde.

25 Fragmente (b), (c) und (d) aus Fig. 18 werden vereinigt und kloniert in die XbaI/XhoI-Stelle von pGP1 unter Bildung von pHIG2, das ein 10,6 kb Insert enthält.

30 Diese Klonierung wird nacheinander durchgeführt. Zunächst werden das 5,2 kb Fragment (b) in Fig. 18 und das 2,2 kb Fragment (d) von Fig. 18 mit Kalbsdarm-alkalischer Phosphatase behandelt und kloniert in pGP1, das mit XhoI und XbaI verdaut wurde. Die erhaltenen Klone werden gescreent mit dem 5,2 und 2,2 kb Insert. Die Hälfte der positiv getesteten Klone mit den 5,2 und 2,2 kb Inserts haben das 5,2 kb Insert in der korrekten Orientierung wie durch



BamHI-Verdau bestimmt wurde. Das 3,2 kb XbaI-Fragment aus Fig. 18 wird dann kloniert in das Plasmid-Zwischenprodukt, das die Fragmente (b) und (d) enthält, unter Bildung von pHIG2 (Fig. 9). Dieses Plasmid enthält Diversitätssegmente kloniert in den Polylinker mit einer einzigen 5' SfiI-Stelle und einer einzigen 3' SpeI-Stelle. Der gesamte Polylinker wird flankiert von NotI-Stellen.

#### H. Konstruktion des schweren Kette-Mini-Locus

Nachfolgend wird die Konstruktion eines menschlichen schwere Kette-Mini-Locus beschrieben, der ein oder mehrere V-Segmente enthält.

Ein nicht-rearrangiertes V-Segment, das dem in dem Hybridom von Newkirk et al. enthaltenen V-Segment, entspricht, Newkirk et al., 1988, J. Clin. Invest., 81, 1511-1518, wird isoliert mit dem folgenden Oligonucleotid:

5'- GAT CCT GGT TTA GTT AAA GAG GAT TTT ATT CAC CCC TGT GTC -3'

Eine Restriktionskarte des nicht-rearrangierten V-Segments wird bestimmt zum Identifizieren einziger Restriktionsschnittstellen, die nach Verdau ein DNA-Fragment mit einer Länge von etwa 2 kb mit dem nicht-rearrangierten V-Segment zusammen mit dem 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen. Die 5'-Sequenzen umfassen den Promotor und andere regulatorische Sequenzen, während die 3'-flankierenden Sequenz Rekombinationssequenzen zur V-DJ-Verbindung liefern. Dieses ungefähr 3,0 kb V-Segment-Insert wird kloniert in den Polylinker von pGB2 unter Bildung von pVH1.

pVH1 wird verdaut mit SfiI und das resultierende Fragment wird kloniert in die SfiI-Stelle von pHIG2 unter Bildung von pHIG5'. Da pHIG2 nur D-Segmente enthält, enthält das anfängende pHIG5'-Plasmid ein einzelnes V-Segment zusammen mit D-Segmenten. Das Insert in pHIG5 hat eine Größe von 10,6 kb und zusätzlich die Größe des V-Segment-Inserts.

Das Insert von pHIG5 wird herausgeschnitten durch Verdau mit NotI und SpeI und isoliert. pHIG3' mit J-, C $\mu$ - und C $\gamma$ 1-Segmente, wird verdaut mit SpeI und NotI und das 3' kb Frag-

ment mit solchen Sequenzen und der Ratten-3'-Enhancer-Sequenz wird isoliert. Diese beiden Fragmente werden vereinigt und ligiert in NotI-verdauten pGP1 unter Bildung von pHIG, welcher ein Insert enthält, das ein V-Segment, 9 D-Segmente, 6 funktionelle J-Segmente, C $\mu$ , C $\gamma$  und den Ratten-3'-Enhancer codiert. Die Größe dieses Inserts ist ungefähr 43 kb zusätzlich zur Größe des V-Segment-Inserts.

#### I. Konstruktion des schweren Kette-Mini-Locus durch homologe Rekombination

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt hat das Insert von pHIG eine Größe von ungefähr 43 bis 45 kb, wenn ein einzelnes V-Segment verwendet wird. Diese Insert-Größe ist am oder nahe der Grenze dessen, was leicht in Plasmid-Vektoren kloniert werden kann. Um die Verwendung einer größeren Anzahl an V-Segmenten zu ermöglichen, wird nachstehend die *in vivo* homologe Rekombination überlappender DNA-Fragmente beschrieben, die nach homologer Rekombination in einer Zygote oder ES-Zelle ein Transgen bilden, das die Ratten-3'-Enhancer-Sequenz, die menschlichen C $\mu$ , die menschlichen C $\gamma$ , humane J-Segmente, humane D-Segmente und eine Vielzahl von humanen V-Segmenten enthält.

Ein 6,3 kb BamHI/HindIII-Fragment mit menschlichen J-Segmenten (vgl. Fragment (a) in Fig. 14) wird kloniert in MluI/SpeI-verdautem pHIG5' mit folgenden Adaptoren:

5'- GAT CCA AGC AGT -3'  
 5'- CTA GAC TGC TTG -3'  
 5'- CGC GTC GAA CTA -3'  
 5'- AGC TTA GTT CGA -3'

Das resultierende Plasmid wird als pHIG5'0 (Überlappung) bezeichnet. Das in diesem Plasmid enthaltene Insert enthält humane V-, D- und J-Segmente. Bei Verwendung des einzelnen V-Segments aus pVH1, hat dieses Inserts eine Größe von ungefähr 17 kb zusätzlich zu 2 kb. Dieses Insert wird isoliert und vereinigt mit dem Insert aus pHIG3', das die humanen J, C $\mu$ , C $\gamma$ 1 und Ratten-3'-Enhancer-Sequenzen enthält. Beide Inserts enthalten humane J-Segmente die ungefähr 6,3 kb der Überlappung zwischen den beiden DNA-Fragmenten liefern. Bei der

Koinjektion in die Mauszygote tritt *in vivo* homologe Rekombination ein, und erzeugt ein Transgen entsprechend dem Insert in pHIG.

Diese Verfahrensweise ermöglicht das Einfügen einer Mehrzahl an V-Segmenten in das *in vivo* gebildete Transgen. Anstelle der Insertion eines einzigen V-Segments in pHIG5' kann beispielsweise eine Mehrzahl an V-Segmenten in (1) isolierter genomischer DNA, (2) ligierter DNA abgeleitet von genomischer DNA oder (3) DNA, die ein synthetisches V-Segment-Repertoire codiert, in pHIG2 in die SfiI-Stelle zur Erzeugung von pHIG5' V<sub>N</sub> kloniert werden. Das J-Segmente-enhaltende Fragment (a) von Fig. 14 wird dann in pHIG5' V<sub>N</sub> kloniert und das Insert wird isoliert. Dieses Insert enthält nun eine Mehrzahl an V-Segmenten und J-Segmenten, die mit den aus dem pHIG3' isolierten Insert enthaltenen J-Segmenten überlappen. Bei der gemeinsamen Einführung in den Kern einer Mauszygote erfolgt homologe Rekombination unter *in vivo*-Bildung des Transgens, das die mehrfachen V-Segmente und mehrfachen J-Segmente, mehrfachen D-Segmente, die C<sub>μ</sub>-Region, die C<sub>γ</sub>1-Region, alle von Mensch) und die Ratten-3'-Enhancer-Sequenz kodiert.

J. Konstruktion des schwere Kette-Mini-Locus durch Koinjektion von synthetischen VH-Region-Fragment zusammen mit schwere Kette DJC-Konstrukt

Synthetische VH-Region-Fragmente werden erzeugt und isoliert wie vorstehend beschrieben. Diese Fragmente werden koinjiziert mit aufgereinigtem NotI-Insert von Plasmid pHIG (oder einer Version von pHIG, die keine V-Segmente enthält). Die koinjizierten DNA-Fragmente werden inseriert in eine einzige Stelle im Chromosom. Einige der resultierenden transgenen Tiere enthalten transgene Inserts mit synthetischen V-Regionen angrenzend und stromaufwärts von den Sequenzen im pHIG-Konstrukt. Diese Tiere haben ein größeres menschliches schwere Kette-Primärrepertoire haben als die in Beispiel 5 (H) beschriebenen Tiere.

**BEISPIEL 6****Konstruktion des leichten Kette-Mini-Locus****A. Konstruktion von pEμ1**

5

Die Konstruktion von pEμ1 ist dargestellt in Fig. 21. Der Maus-schwere Kette-Enhancer wird isoliert aus dem XbaI bis EcoRI 678 bp Fragment (J. Banerji et al., 1983, Cell, 33, 729-740) aus Phagen-Klonen mit folgendem Oligo:

10

5'- GAA TGG GAG TGA GGC TCT CTC ATA CCC TAT TCA GAA CTG ACT -3'

Dieses Eμ-Fragment wird kloniert in den EcoRV/XbaI-verdauten pGPI durch Glatt-End-Auffüllung (blunt end filling) der EcoRI-Stelle. Das resultierende Plasmid wird genannt pEμ1.

15

**B. Konstruktion des κ-leichten Kette-Mini-Locus**

20

Das κ-Konstrukt enthält mindestens ein humanes V<sub>κ</sub>-Segment, alle fünf humanen J<sub>κ</sub>-Segmente, den humanen J-C<sub>κ</sub>-Enhancer, humanes κ-konstante Region Exon und vorzugsweise den humanen 3'-κ-Enhancer (K. Meyer et al., 1989, EMBO J., 8, 1959-1964). Der κ-Enhancer in der Maus liegt 9 kb stromabwärts von C<sub>κ</sub>. Er ist jedoch bis jetzt im Menschen nicht identifiziert. Zusätzlich enthält das Konstrukt eine Kopie des Maus schwere Kette-J-Cμ-Enhancers.

25

Der Mini-Locus wird konstruiert aus 4 Bestandteil-Fragmenten:

30

(a) Ein 16 kb SmaI-Fragment, das das humane C<sub>κ</sub>-Exon und den 3' humanen Enhancer enthält mit Analogie mit dem Maus-Locus (Fragment (a) in Fig. 20);

(b) Ein 5' angrenzendes 5 kb SmaI-Fragment, das alle 5 J-Segmente enthält (Fragment (b) in Fig. 20);

(c) Der Maus schwere Kette intronische Enhancer isoliert aus pE $\mu$ 1 (die Sequenz wird integriert zur Induktion der möglichst frühzeitigen Expression des leichten Kette-Konstrukts in der B-Zellentwicklung. Da die schweren Kette-Gene früher transkribiert werden als die leichte Kette-Gene, ist dieser schwere Kette-Enhancer vermutlich zu einem früheren Stadium aktiv als der intronische  $\kappa$ -Enhancer); und

(d) Ein Fragment mit einem oder mehreren V-Segmente. Dieses Konstrukt wird folgendermaßen hergestellt. Humane Plazenta-DNA wird verdaut mit SmaI und fraktioniert auf einem Agarosegel durch Elektrophorese. In ähnlicher Weise wird humane Plazenta-DNA verdaut mit BamHI und fraktioniert durch Elektrophorese. Die 16 kb Fraktion wird isoliert aus dem SmaI-verdautes Gel und die 11 kb Region wird in ähnlicher Weise isoliert aus dem Gel, das BamHI verdaute DNA enthält.

Die 16 kb SmaI-Fraktion wird kloniert in Lambda FIX II (Stratagene, La Jolla, California), die verdaut wurde mit XhoI, behandelt mit Klenow-Fragment-DNA-Polymerase, Zum Auffüllen des XhoI-Restriktions-Verdauprodukts. Die Ligation der 16 kb SmaI-Fraktion zerstört die SmaI-Stellen und beläßt die XhoI-Stellen unberührt.

Die 11 kb BamHI-Fraktion wird kloniert in  $\lambda$  EMBL3 (Stratagene, La Jolla, California), das vor dem Klonieren mit BamHI verdaut worden ist.

Klone aus jeder Bibliothek werden mit dem C $\kappa$ -spezifischen Oligo als Sondenmolekül behandelt:

5'- GAA CTG TGG CTG CAC CAT CTG TCT TCA TCT TCC CGC CAT CTG -3'

Ein 16 kb XhoI Insert, das subkloniert wurde in den XhoI-geschnittenen pE $\mu$ 1, so daß C $\kappa$  angrenzend ist an die SmaI-Stelle. Das resultierende Plasmid wird pKap1 genannt; vgl. Fig. 22.

Das vorstehende C $\kappa$ -spezifische Oligonucleotid wird verwendet als Sondenmolekül für die  $\lambda$  EMBL3/BamHI-Bibliothek zum Identifizieren eines 11 kb Klon entsprechend dem Frag-



ment (d) von Fig. 20. Ein 5 kb SmaI-Fragment (Fragment (b) in Fig. 20) wird subkloniert und nachfolgend inseriert in den mit SmaI verdauten pKap1. Diese Plasmide, die die korrekte Orientierung der J-Segmente, C<sub>x</sub> und des E<sub>μ</sub>-Enhancers enthalten, werden pKap2 genannt.

- 5 Ein oder mehrere V<sub>K</sub>-Segmente werden danach subkloniert in die MluI-Stelle von pKap2 unter Bildung des Plasmids pKapH, das die menschlichen V<sub>K</sub>-Segmente, die menschlichen J<sub>K</sub>-Segmente, die menschlichen C<sub>K</sub>-Segmente und den menschlichen E<sub>μ</sub>-Enhancer codiert. Dieses Insert wird herausgeschnitten durch Verdau von pKapH mit NotI und aufgereinigt durch Agarosegelelektrophorese. Das gereinigte Insert wird in den Pronucleus einer Mauszygote wie vorstehend beschrieben mikroinjiziert.

#### C. Konstruktion eines κ-leichte Kette-Mini-Locus durch *in vivo* homologe Rekombination

- 15 Das 11 kb BamHI-Fragment (Fragment (d) in Fig. 20) wird kloniert in den BamHI-verdauten pGP1, so daß das 3'-Ende zur SfiI-Stelle gerichtet ist. Das resultierende Plasmid wird pKAPint genannt. Ein oder mehrere V<sub>K</sub>-Segmente werden inseriert in den Polylinker zwischen die BamHI- und SpeI-Stellen in pKAPint zur Bildung von pKapHV. Das Insert von pKapHV wird herausgeschnitten durch Verdau mit NotI und aufgereinigt. Das Insert von pKap2 wird herausgeschnitten durch Verdau mit NotI und aufgereinigt. Jedes dieser Frag-  
20 mente enthält Homologie-Regionen, weil das Fragment aus pKapHV eine 5 kb DNA-Sequenz enthält, die die J<sub>K</sub>-Segmente einschließt, und die im wesentlichen homolog sind zu dem 5 kb SmaI-Fragment, das in dem aus pKap2 erhaltenen Insert enthalten ist. Diese Inserts sind als solche in der Lage, homolog zu rekombinieren, bei Mikroinjektion in eine Mauszygote unter Bildung eines Transgens, das V<sub>K</sub>, J<sub>K</sub> und C<sub>K</sub> codiert.

25

#### D. Konstruktion eines κ-leichte Kette-Mini-Locus durch Koinjektion eines synthetischen V<sub>K</sub>-Region-Fragments zusammen mit leichte Kette-JC-Konstrukt

- Synthetische V<sub>K</sub>-Region-Fragmente werden erzeugt und isoliert wie vorstehend beschrieben.  
30 Diese DNA-Fragmente werden koinjiziert mit dem aufgereinigten NotI-Insert des Plasmids pKap2 oder des Plasmids pKapH. Die koinjizierten DNA-Fragmente werden inseriert in eine einzige Stelle im Chromosom. Einige der resultierenden Transgene werden transgene Inserts



enthalten, die synthetische V-Regionen haben, die benachbart und stromaufwärts von den Sequenzen im pKap2- oder pKapH-Konstrukt liegen. Diese Tiere werden ein größeres humane  $\kappa$ -leichte Kette-Primärrepertoire haben als jene, beschrieben in Beispiel 6(B).

5

### BEISPIEL 7

Isolierung genomischer Klone entsprechend den rearrangierten  
und exprimierten Kopien der Immunglobulin  $\kappa$ -leichte Kette-Gene

10

Dieses Beispiel beschreibt die Klonierung von Immunglobulin  $\kappa$ -leichte Kette-Genen aus kultivierten Zellen, die ein interessierendes Immunglobulin exprimieren. Solche Zellen können mehrfache Allele eines gegebenen Immunglobulins enthalten. Beispielsweise könnte ein Hybridom vier Kopien enthalten des  $\kappa$ -leichte Kette-Gens, zwei Kopien von der Fusionspartner-Zelllinie und zwei Kopien von der ursprünglichen B-Zelle, die das interessierende Immunglobulin exprimieren. Von diesen vier Kopien codiert nur eine das interessierende Immunglobulin trotz der Tatsache, daß mehrere von ihnen rearrangiert sein können. Das in diesem Beispiel beschriebene Verfahren erlaubt das selektive Klonieren der exprimierten Kopie des  $\kappa$ -leichten Kette-Gens.

15

#### A. Doppelsträngige cDNA

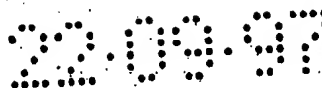
20

Zellen aus menschlicher Hybridoma oder Lymphoma oder einer anderen Zelllinie, die entweder die Zelloberflächen-Form oder die sezernierte Form oder beide Formen von IgM mit einer  $\kappa$ -leichten Kette synthetisiert, werden verwendet für die Isolierung von PolyA<sup>+</sup> RNA. Die RNA wird dann verwendet für die Synthese von Oligo-dT geprimter cDNA mit dem Enzym reverse Transkriptase. Die einzelsträngige DNA wird dann isoliert und G-Reste werden mit dem Enzym Polynucleotid-terminale Transferase an das 3'-Ende hinzugefügt. Die einzelsträngige cDNA mit G-Schwanz wird dann aufgereinigt und verwendet als Template für die Synthese des zweiten Stranges (katalysiert von dem Enzym DNA Polymerase) mit folgendem Oligonucleotid als Primer:

25

30

5'- GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG CCC CCC CCC CCC -3'



Die doppelsträngige cDNA wird isoliert und zur Bestimmung der Nucleotidsequenz des 5'-Endes der mRNAs verwendet, die die schweren und leichten Ketten des exprimierten Immunglobulin-Moleküls codieren. Genomische Klone dieser exprimierten Gene werden dann isoliert. Das Verfahren zum Klonieren der exprimierten leichten Kette-Gene wird nachstehend in B erläutert.

#### B. Leichte Kette

Die in A beschriebene doppelsträngige cDNA beschrieben in Teil A wird denaturiert und als Template für eine dritte Runde der DNA-Synthese mit folgendem Oligonucleotid-Primer verwendet:

5'- GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG TCA TCA GAT GGC GGG AAG  
ATG AAG ACA GAT GGT GCA -3'

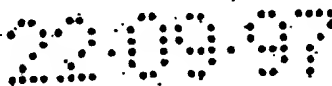
Dieser Primer enthält spezifische Sequenzen für den konstanten Teil der  $\kappa$ -leichte Kette-mRNA (message) (TCA TCA GAT GGC GGG AAG ATG AAG ACA GAT GGT GCA) ebenso wie einzigartige Sequenzen, die als Primer für die PCR-Amplifikation des neu synthetisierten DNA-Stranges (GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG) verwendet werden können. Die Sequenz wird durch PCR amplifiziert mit folgenden zwei Oligonucleotid-Primern:

5'- GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG -3'

5'- GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG -3'

Die PCR-amplifizierte Sequenz wird dann aufgereinigt durch Gelelektrophorese und verwendet als Template für die Dideoxy-Sequenzierungen mit folgendem Oligonucleotid als Primer:

5'- GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG -3'



Die ersten 42 Nucleotide der Sequenz werden dann verwendet zur Synthese eines einzigartigen Sondenmoleküls zum Isolieren des Gens, von dem die Immunglobulin-mRNA (message) transkribiert wurde. Dieses synthetische 42 Nucleotide DNA-Segment wird nachstehend als o-kappa bezeichnet.

5

Ein Southern-Blot von DNA isoliert aus der Ig-exprimierenden Zelllinie und einzeln und in paarweiser Kombination verdaut mit mehreren unterschiedlichen Restriktionsendonucleasen einschließlich SmaI wird dann behandelt mit dem 32-P gelabelten einzigartigen Oligonucleotid o-kappa als Sondenmolekül. Eine einzige Restriktionsendonucleasestelle wird stromaufwärts von dem rearrangierten V-Segment nachgewiesen.

10

DNA aus der Ig-exprimierenden Zelllinie wird dann geschnitten mit SmaI und einem zweiten Enzym (oder BamHI oder KpnI, sofern in dem V-Segment eine SmaI-Stelle vorliegt). Irgendwelche resultierenden nicht-glatt endenden Enden werden behandelt mit dem Enzym T4 DNA Polymerase unter Bildung von glatt endenden DNA-Molekülen. Sodann Restriktionsstelle-enhaltende Linker (BamHI, EcoRI oder XhoI, je nachdem, welche Schnittstelle im Fragment nicht vorhanden ist) inseriert und geschnitten mit dem entsprechenden Linker-Enzym unter Bildung von DNA-Fragmenten mit BamHI-, EcoRI- oder XhoI-Enden. Die DNA wird dann aufgetrennt nach Größe durch Agarosegelelektrophorese und die Fraktion einschließlich des DNA-Fragments, das das exprimierte V-Segment abdeckt, wird kloniert in Lambda EMBL3 oder Lambda FDX (Stratagene, La Jolla, California). V-Segment-enhaltende Klone werden isoliert mit einzigartigem o-kappa als Sondenmolekül. DNA wird isoliert aus positivem Klon und subkloniert in den Polylinker von pKap1. Der resultierende Klon wird genannt pRKL.

15

20

25

### BEISPIEL 8

Isolierung von genomischen Klonen entsprechend  
rearrangierten exprimierten Kopien von Immunglobulin schwere Kette  $\mu$ -Genen

30

Dieses Beispiel beschreibt die Klonierung von Immunglobulin schwere Kette  $\mu$ -Genen aus kultivierten Zellen des exprimierten interessierenden Immunglobulins. Das in diesem Bei-



spiel beschriebene Verfahren gestattet das effektive Klonieren einer exprimierten Kopie eines  $\mu$ -schwere Kette-Gens.

- 5 Gemäß Beispiel 7, Teil A wird doppelsträngige cDNA hergestellt und isoliert. Die doppelsträngige cDNA wird denaturiert und als Template für eine dritte Runde der DNA-Synthese mit folgendem Oligonucleotid-Primer verwendet:

5'- GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG ACA GGA GAC GAG GGG GAA  
AAG GGT TGG GGC GGA TGC -3'

10

- Dieser Primer enthält Sequenzen, die spezifisch für den konstanten Teil der  $\mu$ -schwere Kett-mRNA (message) (ACA GGA GAC GAG GGG GAA AAG GGT TGG GGC GGA TGC) sind ebenso wie einzigartige Sequenzen, die als Primer für die PCR-Amplifikation des neu synthetisierten DNA-Stranges (GTA CGC CAT ATC AGC TGG ATG AAG) verwendet werden können. Die Sequenz wird amplifiziert durch PCR mit folgenden zwei Oligonucleotid-Primern:

5'- GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG -3'

5'- GTA CTC CAT ATC AGC TGG ATG AAG -3'

20

- Die PCR-amplifizierte Sequenz wird dann aufgereinigt durch Gelelektrophorese und verwendet als Template für die Didesoxy-Sequenzierungen mit folgendem Oligonucleotid als Primer:

5' - GAG GTA CAC TGA CAT ACT GGC ATG - 3'

25

- Die ersten 42 Nucleotide der Sequenz werden dann zur Synthese eines einzigartigen Sondenmoleküls zum Isolieren des Gens verwendet, von dem die Immunglobulin-mRNA (message) transkribiert wurde. Dieses synthetische 42 Nucleotide DNA-Segment wird nachstehend als o- $\mu$  bezeichnet.

30

- Ein Southern-Blot von DNA isoliert aus der Ig-exprimierenden Zelllinie und einzeln sowie in paarweiser Kombination verdaut mit mehreren unterschiedlichen Restriktionsendonucleasen einschließlich MluI (MluI ist ein selten schneidendes Enzym, das zwischen dem J-Segment

und  $\mu$  CH1 spaltet) wird sodann mit dem 32-P gelabelten einzigartigen Oligonucleotid o- $\mu$  als Sondenmolekül behandelt. Eine einzige Restriktionsendonuclease-Stelle wird stromaufwärts von dem rearrangierten V-Segment identifiziert.

- 5 DNA aus der Ig-exprimierenden Zelllinie wird dann geschnitten mit MluI und einem zweiten Enzym. MluI- oder SpeI-Adaptor-Linker werden dann ligiert an die Enden und geschnitten, um die 5'-Stelle zu MluI oder SpeI umzuwandeln. Die DNA wird dann durch Agarosegelelektrophorese nach Größe aufgetrennt und die Fraktion einschließlich des DNA-Fragments, das das exprimierte V-Segment abdeckt, wird direkt kloniert in das Plasmid pGP1. V-Segment-enhaltende Klone werden isoliert mit dem einzigartigen Sondenmolekül o- $\mu$  und das Insert wird subkloniert in das MluI- oder MluI/SpeI-geschnittene Plasmid pCON2. Das resultierende Plasmid wird pRMGH genannt.
- 10

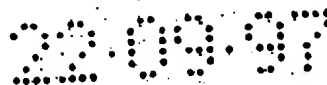
#### BEISPIEL 9

##### Deletion des Maus-schwere Kette-Gens durch homologe Rekombination

- 15 Dieses Beispiel beschreibt die Deletion des endogenen Maus-schwere Kette-Gens durch homologe Rekombination in embryonalen Stamm-(ES)-Zellen (Zijlstra et al., 1989, Nature, 342, 435-438). Sodann werden diese ES-Zellen in einen Maus-Blastozystenembryo transplantiert. Die ES-Zellen siedeln sich in der Keimbahn der resultierenden chimären Maus an (Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach, E.J. Robertson, Herausgeber, IRL press, Washington, D.C., 1987).
- 20

- 25 Die Konstruktion einer DNA-Sequenz, die in das Maus-Chromosom homolog rekombiniert, derart daß die schwere Kette J-Segmente deletiert werden und verhindert so die Möglichkeit zum erfolgreichen Gen-Rearrangement am schweren Kette-Locus. Die Herstellung dieses Konstrukts wird nachstehend beschrieben.

- 30 Plasmid pGP1 wird verdaut mit den Restriktionsendonucleasen BamHI und BglII und ligiert zur Bildung des Plasmids pGP1d1. Dieses Plasmid wird dann verwendet zum Aufbau des sogenannten Gen-Knock out-Konstrukts.



Zur Herstellung von Sequenzen, die homolog sind zur gewünschten Ziel (Target)-Region des Maus-Genoms werden genomische Klone aus der Maus isoliert aus einer Phagen-Bibliothek, die aus nicht-lymphoidalem Gewebe (wie Leber) abgeleitet ist. Es wird das J<sub>H</sub>-spezifische Oligonucleotid-Sonden-molekül verwendet:

5' - GGT CTA TGA TAG TGT GAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC - 3'

Ein 3,5 kb KpnI- bis EcoRI-Fragment, das mit diesem Sonden-molekül hybridisiert, wird isoliert aus DNA, die sich aus positiven Phagen-Klonen ableitet. Dieses Fragment wird subkloniert in KpnI/EcoRI-verdautes pGP1d1 unter Bildung des Plasmids pMKO1.

Neomycin-Resistenz (Neo-) und Herpes-Simplex Virus Thymidin-Kinase (TK-) Gene zur Arzneistoff-Selektion von Rekombinanten (M. Capecchi, 1989, Science, 244, 1288-1292) werden dann folgendermaßen isoliert. Das Plasmid pGEM7 (KJ1) (M.A. Rudnicki, 3/15/89) wird mit HindIII verdaut und die Enden geglättet mit der Klenow-Form von DNA pol I. Die DNA wird dann geschnitten mit EcoRI und das pGKNeo-Fragment wird isoliert und kloniert in SphI/NaeI-geschnittenen pMKO1 mit folgendem Oligonucleotid als Adaptor:

5' - AATTCATG - 3'

Das resultierende Plasmid wird als pMKO2 bezeichnet. Dieses Plasmid enthält das Neomycin-Resistenzgen flankiert von Sequenzen, die Maus J<sub>H</sub>-Segmente flankieren. Dieses Plasmid allein kann verwendet werden zur Deletion des schweren Kette-Gens. Alternativ kann das Herpes TK-Gen hinzugefügt werden zu dem Konstrukt zur Verbesserung der Häufigkeit der homologen Rekombinationsereignisse in Neo-resistenten Klonen (M. Capecchi, 1989, Science, 244, 1288-1292). Dies wird folgendermaßen durchgeführt. Das EcoRI bis HindIII PGKTK-Fragment von pGEM7 (TK) (M.A. Rudnicki) wird isoliert und in die KpnI-Stelle von pMKO2 kloniert mit folgenden Oligonucleotiden als Adaptoren:

5' - AATTGTAC - 3'

5' - AGCTGTAC - 3'



Das resultierende Plasmid wird als pMKO3 bezeichnet.

Zur weiteren Verbesserung der Gesamteffizienz der homologen Rekombination wird ein großes DNA-Segment, das homolog zur Zielsequenz ist, an das Konstrukt hinzugefügt, nämlich ein 13 kb EcoRI-Fragment, das mit dem nahestehend beschriebenen Cu-spezifischen Oligonucleotid hybridisiert:

5' - GCA TCC TGG AAG GTT CAG ATG AAT ACC  
TTG TAT GCA AAA TCC - 3'

Dieses 12 kb Fragment umfaßt die Cu-codierenden Exons oder einen wesentlichen Teil des Fragments, das das 5'-EcoRI-Ende umfaßt. Dieses 12 kb Fragment wird aus einer Maus-genomischen Phagen-Bibliothek isoliert und in die EcoRI-Stelle von pMKO3 subkloniert. Das resultierende Plasmid wird bezeichnet als pMKO4.

Das Insert von pMKO4 wird isoliert durch Verdau mit NotI und elektroporiert in ES-Zellen. Homologe Rekombinationsklone werden isoliert und verwendet zum Herstellen einer J<sub>H</sub>-deletierten Maus wie beschrieben von Zijlstra et al., 1989, Nature, 342, 435-438.

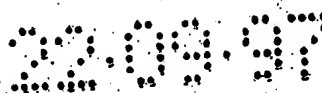
#### BEISPIEL 10

##### Deletion des Maus-leichte Kette-Gens durch homologe Rekombination

Dieses Beispiel beschreibt die Deletion des endogenen Maus-leichte Kette-Gens durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (vgl. vorstehendes Beispiel):

Eine DNA-Sequenz, die homolog rekombiniert in das Maus-Chromosom zum Deletieren der  $\kappa$ -leichte Kette konstante Region-Exons wird konstruiert. Die Herstellung dieses Konstrukts wird nachstehend erläutert.

Ein 2 kb BamHI bis EcoRI Thymidin Kinase-Fragment aus pGEM7 (TK) Sal (M.A. Rudnicki, Whitehead Institute) wird isoliert und subkloniert in BamHI/SfiI-verdautes pGP1 folgendem Oligonucleotid-Adaptor:



5' - AATTTTG - 3'

Das resultierende Plasmid wird bezeichnet als pKKO1.

5

Zur Herstellung von Sequenzen, die homolog zur gewünschten Zielsequenz des Maus-Genoms sind, werden genomische Klone aus der Maus isoliert aus einer Phagen-Bibliothek, die sich aus nicht-lymphoidalem Gewebe (wie Leber) ableitet, mit dem Maus- $\kappa$ -leichte Kette-spezifischen Oligo bezeichnet als O-MKC, das nachstehend angegeben ist:

10

5' - GGC TGA TGC TGC ACC AAC TGT ATC CAT  
CTT CCC ACC ATC CAG - 3'

15

DNA wird isoliert aus positiven Klonen und ein 2,3 kb BglII-Fragment (P.S. Neumaier und H.G. Zachau, 1983, Nucl. Acids Res., 11, 3631-3656), das mit dem Sondenmolekül O-MK3 hybridisiert, wird isoliert. Das Sondenmolekül O-MK3 hat folgende Sequenz:

5' - CAT TCT GGG TAT GAA GAG CCC ACG TAT  
CAA AGG TTA CAT TAG - 3'

20

Dieses 2,3 kb BglII-Fragment wird subkloniert in BamHI-verdauten pKKO1, so daß das 3'-Ende des Fragments an die Polylinker SfiI-Stelle angrenzt. Das resultierende Plasmid wird bezeichnet als pKKO2.

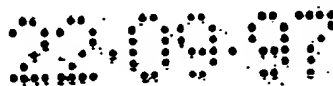
25

Das 4 kb SphI- bis HpaI-DNA-Fragment, das hybridisiert mit dem Oligonucleotid o-MKC wird isoliert aus positivem Phagen-Klon und subkloniert in EcoRV- bis SphI-verdauten Plasmid pKKO2. Das resultierende Plasmid wird bezeichnet als pKKO3.

30

Ein 2 kb SalI- bis EcoRI-Fragment von pGEM7 (KJ1) Sal (M.A. Rudnicki, 3/15/89) wird isoliert und kloniert in die BssHII-Stelle des Plasmids pKKO3 mit Linker-Adaptoren. Zunächst wird ein Gemisch der folgenden drei Oligonucleotide an das 2 kb SalI- bis EcoRI-Fragment ligiert:





5' - CAGCGCGC - 3'

5' - GATCGCGCGCTG - 3'

5' - AATTGCGCGCTG - 3'

5

Die Ligationsmischung wird dann verdaut mit dem Enzym BssHII und ligiert mit BssHII-verdauntem Plasmid pKKO3. Das resultierende Plasmid wird bezeichnet als pKKO4.

10

Das Insert von pKKO4 wird isoliert durch Verdau mit NotI und elektroporiert in ES-Zellen. Homologe Rekombinations-Klone werden isoliert und verwendet zum Herstellen einer  $C_{\kappa}$ -deletierten Maus wie beschrieben bei Zijlstra et al., 1989, Nature, 342, 435-438.

#### BEISPIEL 11

##### Inaktivierung des Maus- $\kappa$ -leichte Kette-Gens durch homologe Rekombination

15

Dieses Beispiel beschreibt die Inaktivierung des Maus-endogenen  $\kappa$ -Locus durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES) und anschließendes Einschleusen des mutierten Gens in die Maus-Keimbahn durch Injektion von getargeten (gezielten) ES-Zellen, die ein inaktiviertes  $\kappa$ -Allel in frühen Maus-Embryos (Blastozysten) tragen.

20

Die Strategie ist das Deletieren von  $J_{\kappa}$  und  $C_{\kappa}$  durch homologe Rekombination mit einem Vektor, der DNA-Sequenzen homolog zum Maus- $\kappa$ -Locus enthält, in dem ein 4,5 kb Segment des Locus, der die  $J_{\kappa}$ - und  $C_{\kappa}$ -Gensegmente umfaßt, deletiert und durch den selektierbaren Marker neo ersetzt wird.

25

##### Konstruktion des $\kappa$ -Targeting-Vektors

Das Plasmid pGEM7 (KJ1) (M.A. Rudnicki, Whitehead Institute) enthält das Neomycin-Resistenzgen (neo) verwendet zur Arzneimittel-Selektion transfizierter ES-Zellen unter der Transkriptionskontrolle des Maus-Phosphoglycero-Kinase (pgk) Promotors (XbaI/I/TaqI-Fragment; Adra C.N. et al., 1987, Gene, 60, 65-74), in den Klonierungs-Vektor pGEM-72f(+). Das Plasmid umfaßt auch eine heterologe Polyadenylierungsstelle für das neo-Gen

30



abgeleitet von der 3'-Region des Maus pgk-Gens (PvuII/HindIII-Fragment; Boer P.H. et al., 1990, Biochemical Genetics, 28, 299-308). Dieses Plasmid wurde verwendet als Ausgangspunkt zur Konstruktion des  $\kappa$ -Targeting-Vektors. Der erste Schritt war, Sequenzen homolog zum  $\kappa$ -Locus 3' von der neo-Expressionskassette zu inserieren.

5

Maus- $\kappa$ -Kette-Sequenzen (Fig. 25a) wurden aus einer genomischen Phagen-Bibliothek, die sich von Leber-DNA ableitet, mit Oligonucleotid-Sondenmolekülen spezifisch für den C $\kappa$ -Locus isoliert:

10

5' - GGC TGA TGC TGC ACC AAC TGT ATC CAT CTT CCC ACC ATC CAG - 3'

und für das J $\kappa$ -5-Gensegment:

15

5' - CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGT AAG - 3'

Ein 8 kb BglII/SacI-Fragment, das über das 3'-Ende des Maus-C $\kappa$ -Segments hinausgeht, wurde isoliert aus einem positiven Phagen-Klon in zwei Stücken, als 1,2 kb BglII/SacI-Fragment und ein 6,8 kb SacI-Fragment und subkloniert in BglII/SacI-verdautes pGEM7 (KJ1). Es wird das Plasmid pNEO-K3' (Fig. 25b) gebildet.

20

Ferner wurde ein 1,2 kb EcoRI/SphI-Fragment, das über das 5'-Ende der J $\kappa$ -Region hinausgeht, isoliert aus einem positiven Phagen-Klon. Ein SphI/XbaI/BglII/EcoRI-Adaptor wurde ligiert an die SphI-Stelle dieses Fragments. Das resultierende EcoRI-Fragment wurde ligiert in EcoRI-verdautes pNEO-K3' in der gleichen 5' nach 3'-Orientierung wie das neo-Gen und den stromabwärts 3'  $\kappa$ -Sequenzen. Es wurde das pNEO-K5'3'-Plasmid erzeugt (Fig. 25c).

25

Sodann wurde das Herpes Simplex Virus (HSV) Thymidin-Kinase (TK) Gen inseriert in das Konstrukt, um die Anreicherung von ES-Klonen mit homologen Rekombinanten zu ermöglichen; vgl. Mansour et al. (1988, Nature, 336, 348-352). Die HSV TK-Kassette wurde erhalten aus dem Plasmid pGEM7 (TK) (M.A. Rudnicki), welches die Struktur-Sequenzen für das HSV TK-Gen enthält eingeklammert vom Maus-pgk-Promotor und Polyadenylierungssequenzen wie vorstehend beschrieben für pGEM7 (KJ1). Die EcoRI-Stelle von pGEM7

30

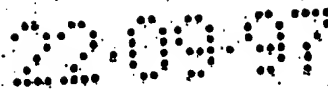
(TK) wurde modifiziert zu einer BamHI-Stelle und die TK-Kassette wurde dann herausgeschnitten als BamHI/HindIII-Fragment und subkloniert in pGP1b zur Herstellung von pGP1b-TK. Dieses Plasmid wurde linearisiert an der XhoI-Stelle und das XhoI-Fragment von pNEO-K5'3', das das neo-Gen enthält, flankiert von genomischen Sequenzen vom 5'-Ende von J $\kappa$  und vom 3'-Ende von C $\kappa$  wurde inseriert in pGP1b-TK zum Herstellen des Targeting-Vektors J/C KI (Fig. 25d). Die mutmaßliche Struktur des genomischen  $\kappa$ -Locus nach homologer Rekombination mit J/C KI ist gezeigt in Fig. 25e.

#### 10 Erzeugung und Untersuchung von ES-Zellen mit zielgerichteter (targeted) Inaktivierung eines Kappa-Allels

15 AB-1 ES-Zellen wurden kultiviert auf mitotisch inaktiven SNL76/7 Zell-Nährschichten (feeder layers) (McMahon A.P. und Bradley A., 1990, Cell, 62, 1073-1085) im wesentlichen gemäß (Robertson E.J., 1987, in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. E.J. Robertson, Herausgeber (Oxford: IRL Press), Seiten 71-112).

20 Der Kappa-Kette-Inaktivierungs-Vektor J/C KI wurde verdaut mit NotI und elektroporiert in AB-1 Zellen nach Hasty P.R. et al., 1991, Nature, 350, 243-246. Elektroporierte Zellen wurden verteilt auf 100 mm Schalen in einer Dichte von  $2.5 \times 10^6$  Zellen/Schale. Nach 24 Stunden wurden G418 (200  $\mu$ g/ml aktiver Bestandteil) und FIAU (0,5  $\mu$ M) hinzugefügt zum Medium und Arzneistoff-resistente Klone konnten sich innerhalb von 10-11 Tagen entwickeln. Klone wurden gepickt, trypsinisiert, in zwei Teile geteilt und weiter expandiert. Die Hälfte der Zellen abgeleitet von jedem Klon wurde dann eingefroren und die andere Hälfte wurde analysiert auf homologe Rekombination zwischen Vektor und Zielsequenzen.

25 Die DNA-Untersuchung wurde durchgeführt durch Southern-Blot-Hybridisierung. DNA wurde isoliert aus den Klonen gemäß (Laird P.W. et al., 1991, Nucl. Acids Res., 19), verdaut mit XbaI und behandelt mit dem in Fig. 25e angegebenen 800 bp EcoRI/XbaI-Fragment als Sondenmolekül als diagnostischem Sondenmolekül. Dieses Sondenmolekül erkennt ein 3,7 kb XbaI-Fragment im Wildtyp-Locus und eine diagnostische 1,8 kb Bande in einem Locus, welcher homolog rekombiniert hat mit dem Targeting-Vektor (vgl. Fig. 25a und e). Von 358 G418 und FIAU-resistenten Klonen gescreent durch Southern-Blot-Untersuchung, zeigten 4



die die homologe Rekombination am Kappa-Locus angehende 1,8 kb XbaI-Bande. Diese 4 Klone wurden weiter verdaut mit den Enzymen BglII, SacI und PstI zum Nachweis, daß der Vektor sich homolog in eines der Kappa-Allele integriert hat. Nach Behandlung mit dem diagnostischen 800 bp EcoRI/XbaI-Fragment als Sondenmolekül ergeben -Wildtyp-DNA-Verdaus mit BglII, SacI und PstI Fragmente von 4,1, 5,4 bzw. 7 kb. Die Gegenwart eines getargeten (gezielten) Kappa-Allels würde durch Fragmente von 2,4, 7,5 bzw. 5,7 kb (vgl. Fig. 25a und e) angezeigt werden. Alle 4 positiven Klone nachgewiesen durch den XbaI-Verdau zeigten die erwarteten BglII, SacI und PstI Restriktionsfragmente, die eine homologe Rekombination an der Kappa-leichten Kette sind.

#### Bildung von Mäusen, die die inaktivierte Kappa-Kette tragen

Die 4 getargeten (gezielten) ES-Klone beschrieben im vorherigen Abschnitt wurden injiziert in C57Bl/6J-Blastocysten gemäß Bradley A., 1987, in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. E.J. Robertson, Herausgeber (Oxford: IRL Press), Seiten 113-151. Die Blastocysten werden transferiert in die Gebärmutter von pseudoschwangeren Weibchen zum Erzeugen von chimären Mäusen, die eine Mischung von Zellen darstellen abgeleitet aus den eingebrachten ES-Zellen und dem Wirts-Blastocyst. Chimäre Tiere werden visuell identifiziert durch die Gegenwart der Agutiefellfärbung abgeleitet von der ES-Zelllinie auf dem Hintergrund von schwarzen C57Bl/6J. Die Abl-ES-Zellen sind eine XY-Zelllinie, so werden männliche Chimären gezüchtet mit C57Bl/6J Weibchen und die Nachkommen überprüft auf die Gegenwart der dominanten Agutiefellfarbe. Agutie-Nachkommen zeigen die Keimbahnübertragung des ES-Genoms an. Die Heterozygotie von Agutie-Nachkommen für die Kappa-Kette-Inaktivierung wird bestätigt durch Southern-Blot-Untersuchung von DNA aus Schwanzbiopsien mit dem diagnostischen Sondenmolekül, das zum Identifizieren von getargeten (gezielten) ES-Klonen verwendet wurde. Bruder-Schwester-Kreuzungen von Heterozygoten werden dann durchgeführt zum Erzeugen von Mäusen, die homozygot für die Kappa-Kette-Mutation sind.

## BEISPIEL 12

Inaktivierung des Maus-schwere Kette-Gens durch homologe Rekombination

5 Dieses Beispiel beschreibt die Inaktivierung des endogenen Maus-Immunglobulin schwere Kette-Locus durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES). Die Strategie ist das Deletieren der endogenen schwere Kette J-Segmente durch homologe Rekombination mit einem Vektor, der schwere Kette-Sequenzen enthält, aus denen die J-Region deletiert worden ist und durch das Gen für den selektierbaren Marker neo ersetzt wurde.

10 Konstruktion eines schwere Kette-Targeting-Vektors

Maus-schwere Kette-Sequenzen, die die J<sub>H</sub>-Region enthalten (Fig. 26a), wurden isoliert aus einer genomischen Phagen-Bibliothek abgeleitet von der D3 ES-Zelllinie (Gossler et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 9065-9069) mit Hilfe eines J<sub>H</sub>4-spezifischen Oligonucleotids als Sondenmolekül:

15 5' - ACT ATG CTA TGG ACT ACT GGG GTC AAG GAA CCT CAG TCA CCG - 3'

20 Ein 3,5 kb genomisches SacI/StuI-Fragment, das die J-Region überspannt, wurde isoliert aus einem positiven Phagen-Klon und subkloniert in SacI/SmaI-verdaute pUC18. Das resultierende Plasmid wurde bezeichnet als pUC18 J<sub>H</sub>. Das zur Arzneistoffselektion von transfizierten ES-Zellen verwendete Neomycin-Resistenzgen (neo) leitete sich ab von dem Plasmid pGEM7 (KJ1). Die HindIII-Stelle in pGEM7 (KJ1) wurde in eine SalI-Stelle umgewandelt durch Hinzufügen eines synthetischen Adaptors und die neo-Expressionskassette herausgeschnitten durch Verdau mit XbaI/SalI. Die Enden des neo-Fragments wurden dann geglättet durch Behandlung mit der Klenow-Form von DNA polI. Das neo-Fragment wurde subkloniert in die NaeI-Stelle von pUC18 J<sub>H</sub>. Es entsteht das Plasmid pUC18 J<sub>H</sub>-neo (Fig. 26b).

25 Die weitere Konstruktion des Targeting-Vektors wurde ausgeführt in einem Derivat des Plasmids pGP1b. pGP1b wurde verdaut mit dem Restriktionsenzym NotI und ligiert mit dem folgenden Oligonucleotid als Adaptor:

2009-97

5' - GGC CGC TCG ACG ATA GCC TCG AGG CTA TAA ATC TAG AAG AAT TCC  
AGC AAA GCT TTG GC - 3'

5 Das resultierende Plasmid genannt pGMT wurde verwendet zum Aufbau des Maus-Immunglobulin schwere Kette-Targeting-Konstrukts.

10 Das Herpes Simplex Virus (HSV) Thymidin-Kinase (TK) Gen wurde integriert in das Konstrukt, um die Anreicherung von ES-Klonen mit homologen Rekombinanten zu ermöglichen gemäß Mansour et al. (1988, Nature 336, 348-352). Das HSV TK Gen wurde erhalten aus dem Plasmid pGEM7 (TK) durch Verdau mit EcoRI und HindIII. Das TK DNA-Fragment wurde subkloniert in die EcoRI- und HindIII-Stellen von pGMT. Es entsteht das Plasmid pGMT-TK (Fig. 26c).

15 Für eine ausgedehnte Homologieregion zur Zielsequenz wurde ein 5,9 kb genomisches XbaI/XhoI-Fragment 5' von der J<sub>H</sub>-Region abgeleitet von einem positiven genomischen Phagen-Klon durch limitierten Verdau von DNA mit XhoI und partiellem Verdau mit XbaI hergestellt. Wie aus Fig. 26a und 26b ersichtlich ist diese XbaI-Stelle nicht vorhanden in genomischer DNA, sondern vielmehr abgeleitet von Phagen-Sequenzen, die direkt das klonierte genomische schwere Kette-Insert flankieren im positiven Phagen-Klon. Das Fragment wurde subkloniert in XbaI/XhoI-verdautes pGMT-TK. Es entsteht das Plasmid pGMT-TK-J<sub>H</sub>5' (Fig. 26d).

25 Der letzte Schritt der Konstruktion umfaßt das Herausschneiden des 3 kb EcoRI-Fragments aus pUC18 J<sub>H</sub>-neo mit dem neo-Gen und flankierenden genomischen Sequenzen. Dieses Fragment wurde geglättet durch Klenow-Polymerase und subkloniert in die in ähnlicher Weise geglättete XhoI-Stelle von pGMT-TK-J<sub>H</sub>5'. Das resultierende Konstrukt, J<sub>H</sub>KO1 (Fig. 26e), enthält 6,9 kb genomischer Sequenzen, die den J<sub>H</sub>-Locus flankieren mit einer 2,3 kb Deletion, die die J<sub>H</sub>-Region umspannt, in die das neo-Gen inseriert wurde. Fig. 25f zeigt die Struktur eines endogenen schwere Kette-Allels nach homologer Rekombination mit dem Targeting-Konstrukt.

30

## BEISPIEL 13

Erzeugung und Untersuchung von getargeten ES-Zellen

5 AB-1 ES-Zellen (McMahon A.P. und Bradley A., 1990, Cell 62, 1073-1085) wurden kultiviert auf mitotisch inaktiven SNL76/7 Zell-Nährschichten im wesentlichen gemäß Robertson E.J., 1987, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. E.J. Robertson, Herausgeber (Oxford: IRL Press), Seiten 71-112.

10 Der schwere Kette-Inaktivierungs-Vektor  $J_H$ KO1 wurde verdaut mit NotI und elektroporiert in AB-1 Zellen gemäß Hasty P.R. et al., 1991, Nature 350, 243-246. Elektroporierte Zellen wurden verteilt in 100 mm Schalen bei einer Dichte von  $2-5 \times 10^6$  Zellen/Schale. Nach 24 Stunden wurden das Medium versetzt mit G418 (200 mg/ml aktiver Bestandteil) und FIAU (0,5 mM) und Arzneistoff-resistente Klone konnten sich innerhalb von 8-10 Tagen entwickeln. Klone wurden gepickt, trypsinisiert, in zwei Teile geteilt und weiter expandiert. Die  
15 Hälfte der Zellen abgeleitet von jedem Klon wurde dann eingefroren und die andere Hälfte untersucht auf homologe Rekombination zwischen Vektor und Zielsequenzen.

DNA-Analyse wird durchgeführt durch Southern-Blot-Hybridisieren. DNA wird isoliert aus den Klonen gemäß Laird P.W. et al., 1991, Nucl. Acids Res., 19, verdaut mit HindIII und  
20 behandelt mit dem 500 bp EcoRI/StuI-Fragment als Sondenmolekül bezeichnet als das diagnostische Sondenmolekül in Fig. 26f. Dieses Sondenmolekül erkennt ein HindIII-Fragment von 2,3 kb im Wildtyp-Locus, während eine 5,3 kb Bande einen getargeten Locus zeigt, der sich homolog rekombiniert hat mit dem Targeting-Vektor (Fig. 26a und f). Weitere Verdaus mit den Enzymen SpeI, StuI und BamHI wurden durchgeführt zum Bestätigen des  
25 gezielten Zerstörens des schweren Kette-Allels.

**BEISPIEL 14****Schwere Kette-Mini-Locus-Transgen****A. Konstruktion von Plasmid-Vektoren zum Klonieren großer DNA-Sequenzen****1. pGP1a**

Das Plasmid pBR322 wurde verdaut mit EcoRI und StyI und ligiert mit den folgenden Oligonucleotiden:

Oligo-42      5' - CAA GAG CCC GCC TAA TGA GCG GGC TTT TTT TTG CAT  
ACT GCG GCC GCT - 3'

Oligo-43      5' - AAT TAG CGG CCG CAG TAT GCA AAA AAA AGC CCG CTC  
ATT AGG CGG GCT - 3'

Das resultierende Plasmid pGP1a wurde konstruiert zum Klonieren sehr großer DNA-Konstrukte, die durch das selten schneidende Restriktionsenzym NotI herausgeschnitten werden können. Es enthält eine NotI-Restriktionsstelle stromabwärts (relativ zum Ampicillin-Resistenzgen, Amp<sup>R</sup>) eines starken Transkriptionsterminationssignals abgeleitet von dem trpA-Gen (Christie G.E. et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4180). Dieses Terminations-signal vermindert die potentielle Toxizität von in die NotI-Stell inserierten codierenden Sequenzen durch Beseitigen der fortgesetzten (readthrough) Transkription von dem Amp<sup>R</sup>-Gen. Zusätzlich ist dieses Plasmid in geringer Kopienzahl relativ zu den pUC-Plasmiden, da es die pBR322-Kopienzahl-Kontrollregion behält. Die geringe Kopienzahl vermindert weiterhin die potentielle Toxizität der Insert-Sequenzen und vermindert die Selektion gegen große Inserts wegen der DNA-Replikation.

**2. pGP1b**

pGP1 wurde verdaut mit NotI und ligiert mit den folgenden Oligonucleotiden:



2009

Oligo-47 5' - GGC CGC AAG CTT ACT GCT GGA TCC TTA ATT AAT CGA  
TAG TGA TCT CGA GGC - 3'

Oligo-48 5' - GGC CGC CTC GAG ATC ACT ATC GAT TAA TTA AGG ATC  
5 CAG CAG TAA GCT TGC - 3'

Das resultierende Plasmid, pGP1b, enthält eine kurze Polylinker-Region flankiert von NotI-Stellen. Dies erleichtert die Konstruktion großer Inserts, die durch NotI-Verdau herausgeschnitten werden können.

10

### 3. pGPe

Die folgenden Oligonucleotide:

15 Oligo-44 5' - CTC CAG GAT CCA GAT ATC AGT ACC TGA AAC AGG GCT  
TGC - 3'

Oligo-45 5' - CTC GAG CAT GCA CAG GAC CTG GAG CAC ACA CAG CCT  
TCC - 3'

20

wurden verwendet zum Amplifizieren des Immunglobulin schwere Kette 3'-Enhancers (S. Peterson et al., 1990, Nature, 344, 165-168) aus Rattenleber-DNA durch Polymerasekettenreaktionsverfahren.

25 Das amplifizierte Produkt wurde verdaut mit BamHI und SphI und kloniert in BamHI/SphI-verdautes pNNO3 (pNNO3 ist ein pUC-abgeleitetes Plasmid, das einen Polylinker enthält mit folgenden Restriktionsstellen aufgelistet in ihrer Reihenfolge: NotI, BamHI, NcoI, ClaI, EcoRV, XbaI, SacI, XhoI, SphI, PstI, BglII, EcoRI, SmaI, KpnI, HindIII und NotI). Das resultierende Plasmid, pRE3, wurde verdaut mit BamHI und HindIII und das Insert, das den  
30 Ratten-Ig-schwere Kette 3'-Enhancer enthält, wurde kloniert in BamHI/HindIII-verdautes pGP1b. Das resultierende Plasmid, pGPe (Fig. 27 und Tabelle 1) enthält mehrere einzige



## B. Konstruktion des IgM-exprimierenden Mini-Locus-Transgens, pJM1

### 1. Isolierung von J- $\mu$ konstante Region-Klonen und Konstruktion von pJM1

- 5 Eine menschliche Plazenta-genomische DNA-Bibliothek kloniert in den Phagen-Vektor  $\lambda$ EMBL3/Sp6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) wurde gescreent mit dem menschlichen schwere Kette J-Region-spezifischen Oligonucleotid:

10 Oligo-1 5' - GGA CTG TGT CCC TGT GTG ATG CTT TTG ATG TCT GGG GCC AAG -  
3'

- und der Phagen-Klon  $\lambda$ 1.3 wurde isoliert. Ein 6 kb HindIII/KpnI-Fragment aus diesem Klon, das alle sechs J-Segmente ebenso wie als D-Segment DHQ52 und den schwere Kette J- $\mu$  intronischen Enhancer enthält, wurde isoliert. Die gleiche Bibliothek wurde gescreent mit dem menschlichen  $\mu$ -spezifischen Oligonucleotid:

15 Oligo-2 5' - CAC CAA GTT GAC CTG CCT GGT CAC AGA CCT GAC CAC CTA TGA -  
3'

- 20 und der Phagen-Klon  $\lambda$ 2.1 wurde isoliert. Ein 10,5 kb HindIII/XhoI-Fragment, das die  $\mu$ -Klassenwechsel-Region und alle  $\mu$ -konstante Region-Exons enthält, wurde isoliert aus diesem Klon. Diese beiden Fragmente wurden zusammen ligiert mit KpnI/XhoI-verdaulichem pNNO3. Es wurde das Plasmid pJM1 erhalten.

### 25 2. pJM2

- Ein 4 kb XhoI-Fragment wurde isoliert aus Phagen-Klon  $\lambda$ 2.1, das Sequenzen direkt strom-  
abwärts von den Sequenzen in pJM1 enthält einschließlich des sogenannten  $\Sigma\mu$ -Elements, das  
an der  $\mu$ -Deletion in bestimmten IgD-exprimierenden B-Zellen beteiligt ist (H. Yasui et al.,  
30 1989, Eur. J. Immunol. 19, 1399). Dieses Fragment wurde behandelt mit dem Klenow-Frag-  
ment der DNA-Polymerase I und ligiert mit XhoI-geschnittenen, Klenow-behandeltem pJM1.  
Das resultierende Plasmid, pJM2 (Fig. 28) hatte die interne XhoI-Stelle verloren, behielt aber

die 3' XhoI-Stelle aufgrund unvollständiger Reaktion mit dem Klenow-Enzym. pJM2 enthält die gesamte humane J-Region, den schwere Kette J- $\mu$  intronischen Enhancer, die  $\mu$ -Klassenwechsel-Region und alle  $\mu$ -konstante Region-Exons ebenso wie die beiden 0,4 kb direkten Wiederholungen (repeats),  $\sigma\mu$  und  $\Sigma\mu$ , beteiligt an der  $\mu$ -Deletion.

### 3. Isolierung von D-Region-Klonen und Konstruktion von pDH1

Das folgende D-Region-spezifische Oligonucleotid:

10 Oligo-4 5' - TGG TAT TAC TAT GGT TCG GGG AGT TAT TAT AAC CAC AGT GTC -  
3'

wurde verwendet zum Screenen von humaner Plazenta-genomischer Bibliothek auf D-Region-Klone. Phagen-Klone  $\lambda$ 4.1 und  $\lambda$ 4.3 wurden isoliert. Ein 5,5 kb XhoI-Fragment, das die D-Elemente  $D_{K1}$ ,  $D_{N1}$  und  $D_{M2}$  umfaßt (Y. Ichihara et al., 1988, EMBO J., 7, 4141), wurde isoliert aus dem Phagen-Klon  $\lambda$ 4.1. Ein stromaufwärts benachbartes 5,2 kb XhoI-Fragment mit den D-Elementen  $D_{LR1}$ ,  $D_{XP1}$ ,  $D_{XP2}$  und  $D_{A1}$  wurde isoliert aus dem Phagen-Klon  $\lambda$ 4.3. Jedes dieser D-Region XhoI-Fragmente wurde kloniert in die Sall-Stelle des Plasmid-Vektors pSP72 (Promega, Madison, WI) zur Zerstörung der XhoI-Stelle, die die beiden Sequenzen verbindet. Das Stromaufwärts-Fragment wurde dann herausgeschnitten mit XhoI und SmaI und das Stromabwärts-Fragment mit EcoRV und XhoI. Die resultierenden isolierten Fragmente wurden zusammenligiert mit Sall-verdaulichem pSP72. Es wurde das Plasmid pDH1 erhalten. pDH1 enthält ein 10,6 kb Insert, das mindestens 7 D-Segmente umfaßt. Es kann mit XhoI (5') und EcoRV (3') herausgeschnitten werden.

### 4. pCOR1

Das Plasmid pJM2 wurde verdaut mit Asp718 (ein Isoschizomer von KpnI) und der Überhang wurde aufgefüllt mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I. Die resultierende DNA wurde dann verdaut mit ClaI und das Insert isoliert. Dieses Insert wurde ligiert mit dem XhoI/EcoRV-Insert von pDH1 und XhoI/ClaI-verdaulichem pGPe. Es wurde das Plasmid pCOR1 (Fig. 29) erhalten.

### 5. pVH251

Ein 10,3 kb genomisches HindIII-Fragment, das die beiden humanen schwere Kette variable Region-Segmente V<sub>H</sub>251 und V<sub>H</sub>105 (C.G. Humphries et al., 1988, Nature 331, 446) enthält, wurde subkloniert in pSP72. Es wurde das Plasmid pVH251.

### 6. pIGM1

Das Plasmid pCOR1 wurde teilweise verdaut mit XhoI und dem isolierten XhoI/SalI-Insert von pVH251 kloniert in die stromaufwärts XhoI-Stelle. Es wurde das Plasmid pIGM1 (Fig. 30) erhalten. pIGM1 enthält 2 funktionelle humane variable Region-Segmente, mindestens 8 humane D-Segmente, alle 6 humanen J<sub>H</sub>-Segmente, den humanen J- $\mu$ -Enhancer, das humane  $\alpha\mu$ -Element, die humane  $\mu$ -Klassenwechsel-Region, alle humanen  $\mu$ -codierenden Exons und das humane  $\Sigma\mu$ -Element zusammen mit dem Ratten-schwere Kette 3'-Enhancer. Alle diese Sequenzelemente können von diesem Fragment isoliert werden ohne die Vektor-Sequenzen durch Verdau mit NotI und mikroinjiziert in Mausembryo-Pronuclei zur Bildung von transgenen Tieren.

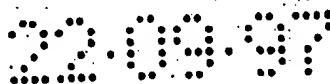
## 20 C. Konstruktion von IgM- und IgG-exprimierendem Mini-Locus-Transgen. pHCl

### 1. Isolierung von $\gamma$ -konstante Region-Klonen

Das folgende Oligonucleotid spezifisch für humane IgG-konstante Region-Gene:

Oligo-29 5' - CAG CAG GTG CAC ACC CAA TGC CCA TGA GCC CAG ACA CTG  
GAC - 3'

wurde verwendet zum Screenen der humanen genomischen Bibliothek. Phagen-Klone  $\lambda$ 29.4 und  $\lambda$ 29.5 wurden isoliert. Ein 4 kb HindIII-Fragment von Phagen-Klon  $\lambda$ 29.4 mit einer  $\gamma$ -Klassenwechsel-Region wurde als Sondenmolekül verwendet für eine genomische DNA-Bibliothek aus humaner Plazenta in den Phagen-Vektor Lambda FIX™ II (Stratagene, La



Jolla, CA) kloniert. Phagen-Klon  $\lambda$ Sy1.13 wurde isoliert. Zur Bestimmung des Subtyps der verschiedenen  $\gamma$ -Klone wurden Didesoxy-Sequenzierungen durchgeführt mit Subklonen aus jedem der drei Phagen-Klone als Templates und folgendem Oligonucleotid als Primer:

5 Oligo-67 5' - TGA GCC CAG ACA CTG GAC - 3'

Der Subtyp der Phagen-Klone  $\lambda$ 29.5 und  $\lambda$ Sy1.13 wurde bestimmt. Beide gehören zum  $\gamma$ 1-Subtyp.

## 10 2. *pye1*

Ein 7,8 kb HindIII-Fragment des Phagen-Klons  $\lambda$ 29.5 mit der  $\gamma$ 1-codierenden Region wurde kloniert in pUC18. Das resultierende Plasmid, pLT1 wurde verdaut mit XhoI, Klenow-behandelt und religiert zum Zerstören der internen XhoI-Stelle. Der resultierende Klon, pLT1xk wurde verdaut mit HindIII und das Insert isoliert und kloniert in pSP72. Es wurde 15 der Plasmid-Klon pLT1xks erhalten. Verdau von pLT1xks an einer Polylinker XhoI-Stelle und einer humanen Sequenz-abgeleiteten BamHI-Stelle erzeugt ein 7,6 kb Fragment mit den  $\gamma$ 1-konstante Region-codierenden Exons. Dieses 7,6 kb XhoI/BamHI-Fragment wurde kloniert zusammen mit einem stromabwärts angrenzenden 4,5 kb BamHI-Fragment von Phagen-Klon  $\lambda$ 29.5 in XhoI/BamHI-verdauten pGPe. Es wurde der Plasmid-Klon *pye1* erhalten. *pye1* 20 enthält alle der  $\gamma$ 1-konstante Region-codierenden Exons, zusammen mit 5 kb von Stromabwärts-Sequenzen verbunden mit dem Ratten-schwere Kette 3'-Enhancer.

## 25 3. *pye2*

Ein 5,3 kb HindIII-Fragment mit der  $\gamma$ 1-Klassenwechsel-Region und dem ersten Exon des Vor-Klassenwechsel sterile Transkripts (P. Sideras et al., 1989, International Immunol. 1, 631) wurde isoliert aus dem Phagen-Klon  $\lambda$ Sy1.13 und kloniert in pSP72 mit der Polylinker XhoI-Stelle angrenzend an das 5'-Ende des Inserts. Es wurde der Plasmid-Klon pSy1s erhalten. Das XhoI/SalI-Insert von pSy1s wurde kloniert in XhoI-verdauten *pye1*. Es wurde der 30 Plasmid-Klon *pye2* (Fig. 31) erhalten. *pye2* enthält sämtliche  $\gamma$ 1-konstante Region-codierenden Exons und die Stromaufwärts-Klassenwechsel-Region und reine (sterile) Transkript-

Exons zusammen mit 5 kb von Stromabwärts-Sequenzen, verbunden mit dem Ratten-schwere Kette 3'-Enhancer. Dieser Klon enthält eine einzige XhoI-Stelle am 5'-Ende des Inserts. Das Gesamt-Insert zusammen mit der XhoI-Stelle und dem 3'-Ratten-Enhancer kann abgetrennt werden von Vektorsequenzen durch Verdau mit NotI.

#### 4. pHCl

Das Plasmid pIGM1 wurde verdaut mit XhoI und das 43 kb Insert isoliert und in XhoI-verdauten pge2 kloniert. Es wurde das Plasmid pHCl (Fig. 30) erhalten. pHCl enthält 2 funktionelle humane variable Region-Segmente, mindestens 8 humane D-Segmente, alle 6 humanen J<sub>H</sub>-Segmente, den humanen J-μ-Enhancer, das humane σμ-Element, die humane μ-Klassenwechsel-Region, alle humanen μ-codierenden Exons, das humane Σμ-Element und die humane γ1-konstante Region einschließlich der assoziierten Klassenwechsel-Region und sterile Transkript-assoziierte Exons zusammen mit dem Ratten-schwere Kette 3'-Enhancer. Alle diese Sequenzelemente können von diesem Fragment isoliert werden können ohne die Vektorsequenzen durch Verdau mit NotI und mikroinjiziert in Mausembryo-Promuclei zur Bildung von transgenen Tieren.

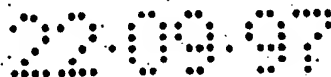
#### D. Konstruktion von IgM- und IgG-exprimierendem Mini-Locus-Transgen pHCl2

##### 1. Isolierung des humane schwere Kette V-Region-Gens VH49.8

Die genomische DNA-Bibliothek aus humaner Plazenta Lambda FIX™ II (Stratagene, La Jolla, CA) wurde gescreent mit dem folgenden human VH1-Familie-spezifischen Oligonucleotid:

Oligo-49 5' - GTT AAA GAG GAT TTT ATT CAC CCC TGT GTC CTC TC ACA  
GGT GTC - 3'

Phagen-Klon λ49.8 wurde isoliert und ein 6,1 kb XbaI-Fragment mit dem variablen Segment VH49.8 wurde subkloniert in pNNO3 (Die Polylinker ClaI-Stelle liegt stromabwärts von VH49.8 und die Polylinker XhoI-Stelle liegt stromaufwärts). Es wurde das Plasmid pVH49.8



erhalten. Eine 800 bp Region dieses Inserts wurde sequenziert. Es wurde gefunden, daß VH49.8 ein offenes Leseraster und intakte Splicing- und Rekombinationssignale hat. Dies zeigt, daß das Gen funktionell ist (Tabelle 2).

5

Tabelle 2 Sequenz des human V<sub>H</sub>I-Familie-Gens V<sub>H</sub>49.8

TTCCTCAGGC AGGATTAGG GCTTGGTCTC TCAGCATOCC AACTTGTAC	50
AGCIGATGIG GCATCIGIGT TTCTTTCTC ATCTAGATC AAGCTTTGAG	100
CIGIGAAATA CCGTGGCTCA TGAATATGA AATAATCTGA GGCTCTCTGA	150
GATAAATATA GATATATTGG TGCCCTGAGA GCATCACATA ACAACCAGAT	200
TCCTCTCTCA AAGAGCCCC TGGGAGCACA GCTCATCACC ATGGACTGGA	250
CCCTGAGGTT CCTCTTTGIG GGGCAGCAG CTACAGGtaa ggggcttct	300
hrTrpArgPh eLeuPheVal ValAlaAlaA laThr	
agtccctaagg ctgaggaagg gatcctgggt tagttaaaga ggattttatt	350
caacccctggt tctctccac agGIGTCCAG TCCAGGTC AGCTGGTGCA	400
GlyValGln SerGlnValG lnLeuValG	
GTCIGGGGCT GAGGTAAGA AGCCTGGGTC CTGGGTGAG GTCTCTGTCA	450
nSerGlyAla GluValLysL ysProGlySe rSerValLys ValSerCysL	
AGGCTTCTGG AGGCAOCTTC AGCAGCTATG CTATCAGCTG GGTGOGACAG	500
ysAlaSerGl yGlyThrPhe SerSerTyrA laIleSerT pValArgGln	
GGCCCTGGAC AAGGGCTTGA GTGGATGGGA AGGATCATCC CTATCTTTGG	550
AlaProGlyG lnGlyLeuGl uTrpMetGly ArgIleIleP roIleLeuGl	
TATAGCAAAC TAGGCACAGA AGTTCAGGG CAGAGTCAG ATTACGGGG	600
yIleAlaAsn TyrAlaGlnL ysPheGlnGl yArgValThr IleThrAlaA	
ACAAATOCAC GAGCACAGCC TACATGGAGC TGAGCAGCCT GAGATCTGAG	650
spLysSerTh rSerThrAla TyrMetGluL euSerSerLe uArgSerGlu	
GACACGGGCG TGTATTACTG TGCGAGAGA ACAGTTTGAA AACCCACATC	700
AspThrAlaV alTyrTyrCy sAlaArg	
CTGAGAGTGT CAGAACCTT GAGGGAGAAG GCAGCTGTGC CGGGCTGAGG	750
AGATGACAGG GTTATTAGG TTTAAGGCTG TTTACAAAT GGGTTATATA	800
TTTGAGAAAA AA	812



## 2. pV2

Ein 4 kb XbaI-genomisches Fragment mit dem humanen V<sub>H</sub>IV-Familie-Gen V<sub>H</sub>4-21 (I. Sanz et al., 1989, EMBO J., 8, 3741), subkloniert in das Plasmid pUC12, wurde herausgeschnitten mit SmaI und HindIII und behandelt mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I. Das  
5 glatt-endende Fragment wurde dann kloniert in ClaI-verdautes, Klenow-behandeltem pVH49.8. Das resultierende Plasmid, pV2, enthält das humane schwere Kette-Gen VH49.8 verknüpft stromaufwärts von VH4-21 in der gleichen Orientierung mit einer einzigen SalI-Schnittstelle am 3'-Ende des Inserts und einer einzigen XhoI-Stelle am 5'-Ende.

## 3. pSy1-5'

Ein 0,7 kb XbaI/HindIII-Fragment (repräsentierend Sequenzen direkt stromaufwärts von und  
angrenzend an das 5,3 kb  $\gamma$ 1-Klassenwechsel-Region-enthaltende Fragment im Plasmid pyc2)  
15 wird zusammen mit dem benachbarten stromaufwärts liegenden 3,1 kb XbaI-Fragment aus dem Phagen-Klon  $\lambda$ Sg1.13 isoliert und in HindIII/XbaI-verdautes pUC18-Vektor kloniert. Das resultierende Plasmid, pSy1-5', enthält ein 3,8 kb Insert, das Sequenzen repräsentiert stromaufwärts von der Initiationsstelle des sterilen Transkripts gefunden in B-Zellen vor dem  
Klassenwechsel zum  $\gamma$ 1-Isotyp (P. Sideras et al., 1989, International Immunol. 1, 631). Da  
20 das Transkript in Verbindung gebracht wird mit der Initiation des Isotyp-Klassenwechsels und da stromaufwärts liegende cis-wirkenden Sequenzen oft wichtig sind für die Transkriptions-Regulation, werden diese Sequenzen integriert in Transgen-Konstrukte, um die korrekte Expression von sterilem Transkript und der assoziierten Klassenwechsel-Rekombination zu fördern.

## 4. pVGE1

Das pSy1-5' Insert wurde herausgeschnitten mit SmaI und HindIII, behandelt mit Klenow-Enzym und ligiert mit dem folgenden Oligonucleotid-Linker:

5' - CCG GTC GAC CGG - 3'

Das Ligationsprodukt wurde verdaut mit Sall und ligiert mit Sall-verdautem pV2. Das resultierende Plasmid, pVP, enthält 3,8 kb von  $\gamma$ 1-Klassenwechsel 5'-flankierenden Sequenzen, die stromabwärts von den beiden humanen variablen Gensegmenten VH49.8 und VH4-21 (vgl. Tabelle 2) verknüpft sind. Das pVP-Insert wird isoliert durch teilweisen Verdau mit Sall und vollständigem Verdau mit XhoI gefolgt von Aufreinigung des 15 kb Fragments auf einem Agarosegel. Das Insert wird dann kloniert in die XhoI-Stelle von pyc2. Es wird der Plasmid-Klon pVGE1 (Fig. 32) erhalten. pVGE1 enthält zwei humane schwere Kette variable Gensegmente stromaufwärts von dem humanen  $\gamma$ 1-konstanten Gen und der assoziierten Klassenwechsel-Region. Eine einzige Sall-Stelle zwischen den variablen und konstanten Regionen kann verwendet werden zum Einklonieren von D-, J- und  $\mu$ -Gensegmenten. Der Ratten-schwere Kette 3'-Enhancer ist verknüpft mit dem 3'-Ende des  $\gamma$ 1-Gens und das gesamte Insert wird flankiert von NotI-Stellen.

### 5. pHC2

Der Plasmid-Klon pVGE1 wird verdaut mit Sall und das XhoI-Insert von pIGM1 wird hinein kloniert. Der resultierende Klon, pHC2 (Fig. 30) enthält 4 funktionelle humane variable Region-Segmente, mindestens 8 humane D-Segmente, alle 6 humanen  $J_H$ -Segmente, den humanen J- $\mu$ -Enhancer, das humane  $\sigma\mu$ -Element, die humane  $\mu$ -Klassenwechsel-Region, alle humanen  $\mu$ -codierenden Exons, das humane  $\Sigma\mu$ -Element und die humane  $\gamma$ 1-konstante Region einschließlich der assoziierten Klassenwechsel-Region und sterilem Transkript-assoziierten Exons, zusammen mit 4 kb flankierenden Sequenzen stromaufwärts von der sterilen Transkript-Initiationsstelle. Diese humanen Sequenzen werden verknüpft mit dem Ratten-schwere Kette 3'-Enhancer, so daß alle Sequenzelemente von diesem Fragment isoliert werden können ohne Vektorsequenzen durch Verdau mit NotI und mikroinjiziert in Mausembryo-Pronuclei zur Bildung von transgenen Tieren. Eine einzige XhoI-Stelle am 5'-Ende des Inserts kann verwendet werden zum Einklonieren zusätzlicher humaner variable Gensegmente zum weiteren Expandieren der Rekombinations-Diversität dieses schwere Kette-Mini-Locus.

### E. Transgene Mäuse

Die NotI-Inserts der Plasmide pIGM1 und pHCl werden isoliert aus Vektorsequenzen durch Agarosegelelektrophorese. Die aufgereinigten Inserts werden mikroinjiziert in die Pronuclei von befruchteten (C57BL/6 x CBA) F2-Mausembryos. Die überlebenden Embryos werden in pseudoschwangere Weibchen gemäß Hogan et al. (B. Hogan, P. Costantini und E. Lacy, *Methods of Manipulating the Mouse Embryo*, 1986, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) übertragen. Mäuse, die sich aus injizierten Embryos entwickelten, wurden untersucht auf die Gegenwart von Transgen-Sequenzen durch Southern-Blot-Untersuchung der DNA aus Schwanz. Transgen-Kopien-Zahl wurde abgeschätzt durch die Bandenintensität relativ zu Standardkontrollen mit bekannten Mengen an klonierter DNA. Im Alter von 3-8 Wochen wurde Serum aus diesen Tieren isoliert und getestet auf die Gegenwart von Transgen-codiertem humanen IgM und IgG1 durch ELISA gemäß Harlow und Lane (E. Harlow und D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

Mikrotiter-Platten-Näpfe wurden beschichtet mit Maus-monoklonalen Antikörpern spezifisch für human IgM (Klon AF6, #0285, AMAC, Inc. Westbrook, ME) und human IgG1 (Klon JL512, #0280, AMAC, Inc. Westbrook, ME). Serumproben wurden seriell verdünnt in den Näpfen und die Gegenwart von spezifischen Immunglobulinen nachgewiesen mit Affinitäts-isoliertem alkalische Phosphatase-konjugiertem Ziege-anti-human-Ig (polyvalent), der vor-adsorbiert war zum Minimieren der Kreuzreaktivität mit Maus-Immunglobulinen. Fig. 33 zeigt die Ergebnisse eines ELISA-Assays auf die Gegenwart von human IgM und IgG1 im Serum von zwei Tieren, die sich entwickelten aus Embryos injiziert mit dem Transgen-Insert von Plasmid pHCl. Eines der Tiere (Nr. 18) war negativ für das Transgen in der Southern-Blot-Untersuchung und zeigte keine nachweisbaren Mengen an human IgM oder IgG1. Das zweite Tier (Nr. 38) enthielt ungefähr 5 Kopien des Transgens wie untersucht durch Southern-Blotting und zeigte nachweisbare Mengen sowohl an human IgM als auch IgG1. Die Ergebnisse der ELISA-Assays für 11 Tiere, die sich aus Transgen-injizierten Embryos entwickelten, ist in Tabelle 3 zusammengefaßt.

**Tabelle 3** Nachweis von human IgM und IgG1 im Serum von transgenen Tieren durch ELISA-Assay

Tier-Nr.	iniziertes Transgen	ungefähre Menge an		
		Transgen	human IgM	human IgG1
		Kopie pro Zelle		
6	pIGM1	1	++	-
7	pIGM1	0	-	-
9	pIGM1	0	-	-
10	pIGM1	0	-	-
12	pIGM1	0	-	-
15	pIGM1	10	++	-
18	pHC1	0	-	-
19	pHC1	1	-	-
21	pHC1	<1	-	-
26	pHC1	2	++	+
38	pHC1	5	++	+

5

Tabelle 3 zeigt den Zusammenhang zwischen der Gegenwart der integrierten Transgen-DNA und der Gegenwart der Transgen-codierten Immunglobuline im Serum. Zwei der Tiere, die nachweislich pHC1-Transgen enthalten, exprimierten keine nachweisbaren Mengen an humanen Immunglobulinen. Diese waren beide niedrig-Kopie-Tiere und mögen nicht vollständige Kopien der Transgene enthalten haben oder die Tiere sind möglicherweise genetische Mosaik (angezeigt durch <1 Kopie pro Zelle geschätzt für Tier-Nr. 21). Die Transgen-enthaltenden Zellen haben möglicherweise die hämatopoetische Linie nicht bevölkert. Alternativ können sich die Transgene in genomische Stellen integriert haben, die nicht zu ihrer Expression führen. Der Nachweis von human IgM im Serum von pIGM1-Transgenen und human IgM und IgG1 in pHC1-Transgenen zeigt, daß die Transgen-Sequenzen korrekt funktionieren beim Steuern von VDJ-Verbindung, Transkription und Isotypen-Klassenwechsel.

15

**BEISPIEL 15****Rearrangierte schwere Kette-Transgene****5 A. Isolierung von rearrangierten humane schwere Kette VDJ-Segmenten**

10 Zwei genomische DNA-Bibliotheken aus humanen Leukozyten kloniert in den Phagen-Vektor  $\lambda$ EMBL3/SP6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) werden gescreent mit einem 1 kb  $PacI/HindIII$ -Fragment von  $\lambda$ 1.3 enthaltend dem humanen schwere Kette  $J-\mu$  intronischen Enhancer. Positive Klone werden getestet auf Hybridisierung mit einem Gemisch folgender  $V_H$ -spezifischer Oligonucleotide:

Oligo-7 5' - TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC  
ACC - 3'

15 Oligo-8 5' - TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC  
AGT - 3'

20 Klone, die sowohl mit V- als auch mit  $J-\mu$ -Sondenmolekülen hybridisieren, werden isoliert und die DNA-Sequenz des rearrangierten VDJ-Segments wird bestimmt.

**B. Konstruktion von rearrangierten humanen schwere Kette-Transgenen**

25 Fragmente mit funktionellen  $VJ$ -Segmenten (offenes Leseraster und Splice-Signale) werden subkloniert in den Plasmid-Vektor pSP72, so daß die Plasmid-abgeleitete  $XhoI$ -Stelle angrenzt an das 5'-Ende der Insert-Sequenz. Ein Subklon mit einem funktionellen VDJ-Segment wird verdaut mit  $XhoI$  und  $PacI$  ( $PacI$ , ein selten schneidendes Enzym, erkennt eine Stelle in der Nähe des  $J-\mu$  intronischen Enhancers). Das Insert wird kloniert in  $XhoI/PacI$ -verdauten pH2 unter Bildung eines Transgen-Konstrukts mit einem funktionellen VDJ-Segment, dem  $J-\mu$  intronischen Enhancer, dem  $\mu$ -Klassenwechselelement, den  $\mu$ -konstante Region-codierenden Exons und der  $\gamma 1$ -konstanten Region einschließlich der sterile Transkript-assoziierten Sequenzen, dem  $\gamma 1$ -Klassenwechsel und den codierenden Exons. Dieses

30

22.09.97

Transgen-Konstrukt wird herausgeschnitten mit NotI und mikroinjiziert in die Pronuclei von Mausembryos. Es entstehen transgenen Tieren wie vorstehend beschrieben.

# BEISPIEL 16

5

## Leichte Kette-Transgene

### A. Konstruktion von Plasmid-Vektoren

10

#### 1. Plasmid-Vektor pGP1c

Plasmid-Vektor pGP1a wird mit NotI verdaut und die folgenden Oligonucleotide werden einligiert:

15

Oligo-81 5' - GGC CGC ATC CCG GGT CTC GAG GTC GAC AAG CTT TCG AGG  
ATC CGC - 3'

Oligo-82 5' - GGC CGC GGA TCC TCG AAA GCT TGT CGA CCT CGA GAC CCG  
GGA TGC - 3'

20

Das resultierende Plasmid, pGP1c, enthält einen Polylinker mit XmaI-, XhoI-, SalI-, HindIII- und BamHI-Restriktionsstellen flankiert von NotI-Stellen.

#### 2. Plasmid-Vektor pGP1d

25

Plasmid-Vektor pGP1a wird verdaut mit NotI und die folgenden Oligonucleotide werden einligiert:

30

Oligo-87 5' - GGC CGC TGT CGA CAA GCT TAT CGA TGG ATC CTC GAG TGC -  
3'

22.09.97

Oligo-88 5' - GGC CGC ACT CGA GGA TCC ATC GAT AAG CTT GTC GAC AGC -  
3'

Das resultierende Plasmid, pGP1d, enthält einen Polylinker mit Sall-, HindIII-, ClaI-,  
5 BamHI- und XhoI-Restriktionsschnittstellen flankiert von NotI-Stellen.

#### B. Isolierung von Jk- und Cx-Klonen

Eine genomische DNA-Bibliothek aus humaner Plazenta kloniert in den Phagen-Vektor  
10 λEMBL3/SP6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) wurde gescreent mit dem  
humane κ-leichte Kette J-Region-spezifischen Oligonucleotid:

Oligo-36 5' - CAC CTT CGG CCA AGG GAC ACG ACT GGA GAT TAA ACG TAA  
15 GCA - 3'

und die Phagen-Klone λ36.2 und λ36.5 werden isoliert. Ein 7,4 kb XhoI-Fragment, das das  
Jκ1-Segment umfaßt, wurde isoliert aus λ36.2 und subkloniert in das Plasmid pNNO3. Es  
entsteht der Plasmid-Klon p36.2. Ein benachbartes 13 kb XhoI-Fragment, das Jκ-Segmente 2  
bis 5 zusammen mit dem Cκ-Gensegment umfaßt, wurde isoliert aus dem Phagen-Klon λ36.5  
20 und subkloniert in das Plasmid pNNO3. Es entsteht der Plasmid-Klon p36.5. Zusammen  
überspannen diese beiden Klone die Region, die 7,2 kb stromaufwärts von Jκ1 beginnt und 9  
kb stromabwärts von Cκ endet.

#### C. Konstruktion von rearrangierten leichte Kette-Transgenen

25 1. pCK1, ein Cκ-Vektor zum Expressieren rearrangierter variabler Gensegmente

Das 13 kb XhoI-Insert des Plasmid-Klons p36.5 mit dem Cκ-Gen zusammen mit den 9 kb  
stromabwärts liegenden Sequenzen wird kloniert in die Sall-Stelle des Plasmid-Vektors  
30 pGP1c mit dem 5'-Ende des Inserts benachbart zu der XhoI-Stelle des Plasmids. Der resultie-  
rende Klon, pCK1, kann klonierte Fragmente mit rearrangierten VJκ-Segmenten in die ein-  
zige 5' XhoI-Stelle aufnehmen. Das Transgen kann dann herausgeschnitten werden mit NotI



und gereinigt werden von Vektorsequenzen durch Gelelektrophorese. Das resultierende Transgen-Konstrukt enthält den humanen J-C $\kappa$  intronischen Enhancer und kann den humanen 3'  $\kappa$ -Enhancer enthalten.

## 5 2. pCK2, ein C $\kappa$ -Vektor mit schwere Kette Enhancern zum Expressieren rearrangierter variabler Segmente

Ein 0,9 kb XbaI-Fragment von genomischer DNA der Maus mit dem Maus-schwere Kette J- $\mu$  intronischen Enhancer (J. Banerji et al., 1983, Cell 33, 729-740) wurde subkloniert in  
10 pUC18 zum Erzeugen des Plasmids pJH22.1. Dieses Plasmid wurde linearisiert mit SphI und die Enden wurden aufgefüllt mit Klenow-Enzym. Die Klenow-behandelte DNA wurde dann verdaut mit HindIII und ein 1,4 kb MluI(Klenow)/HindIII-Fragment des Phagen-Klons  $\lambda$ 1.3 (vorheriges Beispiel) mit dem humanen schwere Kette J- $\mu$  intronischen Enhancer (A. Hayday et al., 1984, Nature 307, 334-340) wurde daran ligiert. Das resultierende Plasmid, pMHE1,  
15 besteht aus Maus- und humanen schwere Kette J- $\mu$  intronischen Enhancern zusammenligiert in pUC18, so daß sie auf einem einzelnen BamHI/HindIII-Fragment herausgeschnitten werden können. Dieses 2,3 kb Fragment wird isoliert und kloniert in pGP1c. Es entsteht pMHE2. pMHE2 wird verdaut mit Sall und das 13 kb XhoI-Insert von p36.5 wird hineinkloniert. Das resultierende Plasmid, pCK2, ist identisch mit pCK1, jedoch sind die Maus- und humanen  
20 schwere Kette J- $\mu$  intronischen Enhancer an das 3'-Ende des Transgen-Inserts gebunden. Zum Modulieren der Expression des fertigen Transgens können analoge Konstrukte erzeugt werden mit unterschiedlichen Enhancern, d.h. dem Maus- oder Ratten-3'  $\kappa$  oder schwere Kette Enhancer (K. Meyer und M.S. Neuberger, 1989, EMBO J., 8, 1959-1964; S. Pettersson et al., 1990, Nature, 344, 165-168).

25

## 2. Isolierung von rearrangierten Kappa-leichte Kette variablen Segmenten

Zwei genomische DNA-Bibliotheken aus humanen Leukozyten kloniert in den Phagen-Vektor  $\lambda$ EMBL3/SP6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) wurden gescreent mit der  
30 humanen Kappa-leichte Kette J-Region mit dem 3,5 kb XhoI/SmaI-Fragment von p36.5. Positive Klone wurden getestet auf Hybridisierung mit dem folgenden V $\kappa$ -spezifischen Oligonucleotid:





Oligo-65 5' - AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC  
ACC ATC AGC - 3'

- 5 Klone, die sowohl mit V- als auch mit J-Sondenmolekülen hybridisierten, wurden isoliert und die DNA-Sequenz des rearrangierten VJ<sub>K</sub>-Segments wurde bestimmt.

### 3. Bildung von transgenen Mäusen mit rearrangierten humanen leichte Kette-Konstrukten

- 10 Fragmente mit funktionellen VJ-Segmenten (offenes Leseraster und Splice-Signale) werden subkloniert in die einzigen XhoI-Stellen der Vektoren pCK1 und pCK2. Es werden rearrangierte Kappa-leichte Kette-Transgene erhalten. Die Transgen-Konstrukte werden abgetrennt von Vektorsequenzen durch Verdau mit NotI. Agarosegel-aufgereinigtes Insert wird mikroinjiziert in Mausembryo-Pronuclei zur Bildung von transgenen Tieren. Tiere, die humane schwere Kette exprimieren, werden gezüchtet mit schwere Kette Mini-Locus-enthaltenden transgenen Tieren (Beispiel 14) zur Bildung von Mäusen, die vollständige humane Antikörper exprimieren.

- 20 Da möglicherweise nicht alle VJ<sub>K</sub>-Kombinationen in der Lage sind, stabile schwere-leichte Kette-Komplexe mit einem breiten Spektrum von unterschiedlichen schwere Kette VDJ-Kombinationen zu bilden, werden mehrere unterschiedliche leichte Kette-Transgen-Konstrukte erzeugt, wobei jedes einen unterschiedlich rearrangierten VJ<sub>K</sub>-Klon verwendet. Transgene Mäuse, die aus diesen Konstrukten hervorgehen, werden gezüchtet mit schwere Kette-Mini-Locus-Transgen-exprimierenden Mäusen. Peripheres Blut, Milz und Lymphknoten-
- 25 Lymphozyten werden isoliert aus Doppelt-Transgenen (sowohl schwere als auch leichte Kette-Konstrukte) Tieren, gefärbt mit fluoreszierenden Antikörpern spezifisch für human und Maus-schwere und leichte Kette-Immunglobuline (Pharmingen, San Diego, CA) und untersucht durch Durchflußzytometrie unter Verwendung eines FACScan-Analyzers (Becton Dickinson, San Jose, CA). Rearrangierte leichte Kette-Transgen-Konstrukte, die zur höchsten
- 30 Menge an human schwere/leichte Kette-Komplexen auf der Oberfläche der größten Anzahl an B-Zellen führen und die sich nicht nachteilig auf das Immunzell-Kompartiment auswirken (untersucht durch Durchflußzytometrie-Untersuchung mit B- und T-Zell-Untergruppen-spe-

22.09.97

zifischen Antikörpern), werden ausgewählt für die Bildung von humanen monoklonalen Antikörpern.

#### D: Konstruktion von nicht-rearrangierten leichte Kette-Mini-Locus-Transgenen

5

##### 1. pJCK1, ein J $\kappa$ -, C $\kappa$ -enthaltender Vektor zum Konstruieren von Mini-Locus-Transgenen

10

15

20

Das 13 kb C $\kappa$ -enthaltende XhoI-Insert von p36.5 wird behandelt mit Klenow-Enzym und kloniert in HindIII-verdautes, Klenow-behandeltes Plasmid pGP1d. Ein Plasmid-Klon wird ausgewählt, so daß das 5'-Ende des Inserts angrenzend ist an die Vektor-abgeleitete ClaI-Stelle. Das resultierende Plasmid, p36.5-1d, wird verdaut mit ClaI und Klenow-behandelt. Das J $\kappa$ 1-enthaltende 7,4 kb XhoI-Insert von p36.2 wird dann Klenow-behandelt und kloniert in ClaI, Klenow-behandelten p36.5-1d. Ein Klon wird ausgewählt, in dem das p36.2-Insert in der gleichen Orientierung ist wie das p36.5-Insert. Dieser Klon, pJCK1 (Fig. 34), enthält die gesamte J $\kappa$ -Region und C $\kappa$  zusammen mit 7,2 kb stromaufwärts liegender Sequenzen und 9 kb stromabwärts liegender Sequenzen. Das Insert enthält auch den humanen J-C $\kappa$  intronischen Enhancer und kann einen humanen 3'  $\kappa$ -Enhancer enthalten. Das Insert wird flankiert von einer einzigen 3' Sall-Stelle, um weitere 3'-flankierende Sequenzen wie schwere Kette oder leichte Kette-Enhancer hineinzuklonieren. Eine einzige XhoI-Stelle liegt am 5'-Ende des Inserts, um nicht-rearrangierte V $\kappa$ -Gensegmente einzuklonieren. Die einzigen Sall- und XhoI-Stellen sind ihrerseits flankiert von NotI-Stellen, die zum Abtrennen des vervollständigten Transgen-Konstrukts von Vektorsequenzen verwendet werden.

25

##### 2. Isolierung von nicht-rearrangierten V $\kappa$ -Gensegmenten und Bildung von transgenen Tieren, die humane Ig-leichte Kette exprimieren

30

Das V $\kappa$ -spezifische Oligonucleotid, Oligo-65 (vorstehend erläutert) wird verwendet als Sondenmolekül für eine genomische DNA-Bibliothek aus humaner Plazenta kloniert in den Phagen-Vektor  $\lambda$ EMBL3/SP6/T7 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA). Variable Gensegmente aus den resultierenden Klonen werden sequenziert und Klone, die funktional erscheinen, werden ausgewählt. Kriterien für das Beurteilen der Funktionalität umfassen: offene Leseraster, intakte Splice-Akzeptor- und -Donor-Sequenzen und intakte Rekombinati-

onssequenz. DNA-Fragmente mit ausgewählten variablen Gensegmenten werden kloniert in die einzige XhoI-Stelle des Plasmids pJCK1 zur Herstellung von Mini-Locus-Konstrukten. Die resultierenden Klone werden verdaut mit NotI und die Inserts werden isoliert und injiziert in Mausembryo-Pronuclei. Es entstehen transgene Tiere. Die Transgene dieser Tiere werden V mit J-Verbindung in sich entwickelnden B-Zellen durchmachen. Tiere, die die humane Kappa-Kette exprimieren, werden gezüchtet mit schwere Kette-Mini-Locus enthaltenden transgenen Tieren (Beispiel 14) zur Bildung von Mäusen, die vollständige humane Antikörper exprimieren.

### BEISPIEL 17

#### Synthetische schwere Kette variable Region

Dieses Beispiel ist erläutert in Fig. 35.

#### A. Konstruktion des Klonierungs-Vektors pVHf

##### 1. pGP1f

Das Plasmid pGP1a (vorheriges Beispiel) wird verdaut mit NotI und die folgenden Oligonucleotide werden mit ihm ligiert:

Oligo-"a" 5' - GGC CGC ATG CTA CTC GAG TGC AAG CTT GGC CAT CCA - 3'

Oligo-"b" 5' - GGC CTG GAT GGC CAA GCT TGC ACT CGA GTA GCA TGC - 3'

Das resultierende Plasmid, pGP1f, enthält SphI, XhoI und HindIII-Stellen flankiert von NotI- und SfiI-Stellen.

## 2. pVHf

Das humane  $V_H$ -V-Familie variable Gensegment  $V_H251$  (C.G. Humphries et al., 1988, Nature, 331, 446) zusammen mit ungefähr 2,4 kb von 5'-flankierenden Sequenzen und ungefähr 1,4 kb von 3'-flankierenden Sequenzen wurde isoliert auf einem 4,2 kb SphI/HindIII-Fragment aus dem Plasmid-Klon pVH251 (vorheriges Beispiel) und kloniert in den Plasmid-Vektor pSelect™-1 (Promega Corp., Madison, WI). Die 5'-flankierenden Sequenzen zusammen mit dem Promotor, erstem Exon und erstem Intron von  $V_H251$  werden amplifiziert durch Polymerasekettenreaktion (PCR) aus diesem Template mit folgenden Oligonucleotiden:

Oligo-83 5' - CAG CTC GAG CTC GGC ACA GGC GCC TGT GGG - 3'

Oligo-84 5' - CTC TAG AGT CGA CCT GCA GGC - 3'

Die 3'-flankierenden Sequenzen werden amplifiziert durch PCR mit den folgenden Oligonucleotiden:

Oligo-85 5' - AGC CTC GAG CCC GTC TAA AAC CCT CCA CAC - 3'

Oligo-86 5' - GGT GAC ACT ATA GAA TAC TCA AGC - 3'

Die amplifizierten 5'-Sequenzen werden verdaut mit SphI und XhoI und die 3'-Sequenzen werden verdaut mit HindIII und XhoI. Die resultierenden Fragmente werden zusammenkloniert in das Plasmid pGP1f. Es entsteht das Plasmid pVHf. Plasmid pVHf enthält die cis-wirkenden regulatorischen Elemente, die die Transkription kontrollieren von  $V_H251$  zusammen mit dem ersten Exon, das die Signalsequenz codiert. pVHf wird verwendet als Expressions-Kassette für schwere Kette variable Sequenzen. Solche Sequenzen werden kloniert in KasI/XhoI-verdautes Plasmid wie nachstehend beschrieben.



## B. Isolierung von variable Gen-codierenden Sequenzen

### 1. Amplifikation von exprimierten $V_H$ -Gen-cDNA-Sequenzen

5 Poly(A)<sup>+</sup> RNA wird isoliert aus humanen peripheren Blutlymphozyten (PBL). Der erste Strang der cDNA wird synthetisiert mit reverse Transkriptase mit Oligo-(dT) als Primer. Der erste Strang cDNA wird isoliert und ein Oligo (dG) Schwanz wird angehängt (tailed) mit terminaler Transferase. Die 5'-Sequenzen von IgM-Transkripten werden dann spezifisch  
10 amplifiziert durch eine Modifikation des Verfahrens nach Frohmann et al. (1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998). Oligo-(dC)<sub>13</sub> und das folgende Oligonucleotid:

Oligo-69 5' - GGA ATT CTC ACA GGA GAC GAG - 3'

werden verwendet als 5'- bzw. als 3'-Primer in einer Polymerasekettenreaktion mit dem ersten  
15 Strang PBL cDNA mit dG-Schwanz. Oligo-69 ist komplementär zu Sequenzen, die die Aminosäuren 11-17 der IgM-konstanten Domäne codieren. Deshalb werden diese Primer DNA-Fragmente amplifizieren von ungefähr 0,6 kb, die exprimierte  $V_H$ -Gensequenzen umfassen.

### 2. Rückumwandlung von cDNA-Sequenzen in die Keimbahnform

20 Das folgende Oligonucleotid:

Oligo-"c" 5' -CTG ACG ACT CTG TAT GGC GCC (CT)A(CG) T(CG) (CT) (CG)AG  
25 (AG)T(CG) CA(AG) CT(GT) GTG (CG)A(AG) TC(GT) GG(GT) - 3'

wird annealed an denaturierte, PCR-amplifizierte IgM 5'-Sequenzen. Oligo-"c" umfaßt ein  
eine 21 Nucleotide nicht-degenerierte Sequenz, die eine Kozak-Stelle umfaßt gefolgt von einer  
30 Nucleotide langen degenerierten Sequenz, die homolog ist zu dem 5'-Ende des zweiten Exons von vielen humanen  $V_H$ -Segmenten (Genbank; Los Alamos, NM). Der Primer wird verlängert mit DNA-Polymerase und das Produkt wird getrennt von nicht verwendetem Primer durch Größenfraktionierung. Das Produkt wird dann denaturiert und annealed an das  
30 folgende Oligonucleotid:



Oligo-"d" 5' GGG CTC GAG GCT GGT TTC TCT CAC TGT GTG T(CGT)T  
(ACGT)(AG)(CT) ACA GTA ATA CA(CT) (AG)G(CT) - 3'

5 Oligo-"d" umfaßt eine 30 Nucleotide lange nicht-degenerierte Sequenz, die eine XhoI-Stelle und einen Teil der V mit DJ-Rekombinations-Sequenz umfaßt gefolgt von einer 21 Nucleotide langen degenerierten Sequenz, die komplementär ist zu der Sequenz, die die letzten sieben Aminosäuren in der Gerüstregion 3 (framework 3) drei vieler humaner variabler Gen-segmente codieren. Das annealte Oligonucleotid wird dann verlängert mit DNA-Polymerase  
10 und das Produkt getrennt von nicht verwendetem Primer durch Größenfraktionierung. Einzelne Runden DNA-Synthese gefolgt vom Entfernen der Primer werden durchgeführt, um die Sequenz-Integrität einzelner variabler Gen-Fragmente zu sichern. Das Produkt der Oligo-"d"-Primer-Verlängerung wird amplifiziert durch PCR mit folgenden zwei Oligonucleotiden als Primer:

15

Oligo-"e" 5' - CTG ACG ACT CTG TAT GGC GCC - 3'

Oligo-"f" 5' - GGG CTC GAG GCT GGT TTC TCT - 3'

20 Das resultierende 0,36 kb PCR-Produkt wird aufgereinigt durch Gelelektrophorese und verdaut mit den Restriktionsenzymen KsaI und XhoI. Verdau-Produkte werden dann kloniert in KsaI/XhoI-verdauten pVHf zur Bildung einer Bibliothek von exprimierten variablen Gensequenzen in Keimbahn-Konfigurationen. Ligation in die KsaI-Stelle von pVHf erzeugt wieder die Splice-Akzeptor-Stelle am 5'-Ende des zweiten Exons, während die Ligation in die XhoI-Stelle wieder das Rekombinationssignal am 3'-Ende des variable Gensegments erzeugt.  
25 Alternative Versionen degenerierter Oligonucleotide "c" und "d" werden verwendet zum Amplifizieren unterschiedlicher Populationen von variablen Genen und erzeugen Keimbahn-Konfigurations-Bibliotheken, die diese unterschiedlichen Populationen repräsentieren (Genbank; Los Alamos, NN).

30

### C. Konstruktion des synthetischen Locus

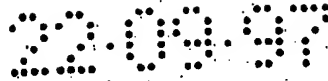
Die gesamte Bibliothek von synthetischen Keimbahn-Konfiguration V<sub>H</sub>-Genen wird zusammen hochgezogen und Plasmid-DNA wird isoliert. Das Plasmid pVHf mittlerer Kopie-Zahl, das einen starken Transkriptionsterminator zwischen dem Ampicillin-Resistenzgen und der Klonierungsstelle umfaßt, wurde hergestellt zum Minimieren der Expansion bestimmter Klone in der Bibliothek. Plasmid-DNA wird verdaut mit SfiI, behandelt mit Kalbsdarmphosphatase zum Abspalten der 5'-Phosphatgruppen und dann verdaut mit NotI. Die Kalbsdarmphosphatase wird vor dem NotI-Verdau entfernt, so daß nur die SfiI-Enden dephosphoryliert werden. Die verdaut DNA wird dann getrennt von Vektorsequenzen durch Agarosegelelektrophorese und ligiert mit den folgenden Oligonucleotiden:

Oligo-"g" 5' - GGC CTA ACT GAG CGT CCC ATA TTG AGA ACC TCC - 3'

15 Oligo-"h" 5' - GGT TCT CAA TAT GGG ACG CTC AGT TA - 3'

Oligo-"h" wird Kinase-behandelt, wobei Oligo-"g" nicht-phosphoryliert zurückbleibt. Die Ligationsreaktion wird durchgeführt mit einem großen molaren Überschuß an Oligonucleotiden, so daß alle V-Genfragment-NotI-Enden ligiert werden mit Oligonucleotiden und nicht mit anderen V-Region-Fragmenten. Da die SfiI-Enden nicht selbst-kompatibel sind, werden sich die V-Segmente in der gleichen Orientierung verketteten, so daß jedes V-Segment getrennt ist durch eine einzelne Oligonucleotid-Abstandshalter-Einheit von dem nächsten V-Segment.

25 Große Konkatemere werden nach Größe (getrennt) durch Elektrophorese und isoliert aus den Agarosegelen. Die Größen-aufgetrennten Konkatemere werden dann direkt koinjiziert in Mausembryo-Pronuclei zusammen mit D-J-C-enthaltenden DNA-Fragmenten (wie die pHCl- oder pHCl2-Inserts) zur Bildung von transgenen Tieren mit großen Primärrepertoires. Alternativ werden die Konkatemere kloniert in einen Plasmid-Vektor wie pGPF.



Laboratory Manual, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Einzelne Hybridoma, die humane Antikörper sezernieren, die spezifisch B-Zell-Untergruppen erkennen, werden ausgewählt.

#### 5 B. Transgene Mäuse, die humane T-Zell-Rezeptorsequenzen exprimieren

DNA-Fragmente, die intakte und vollständig rearrangierte humane T-Zell-Rezeptor (TCR)  $\alpha$ - und  $\beta$ -Gene enthalten, werden koinjiziert in Mausembryo-Pronuclei zur Bildung transgener Tiere. Transgene Tiere werden untersucht durch FACS-Analyse auf die Expression von beiden Transgenen auf der Oberfläche ihrer T-Zellen. Tiere werden ausgewählt, die nur niedrige Mengen humaner  $\alpha$ - und  $\beta$ -TCR-Ketten auf einem Teil ihrer T-Zellen exprimieren. Nur die Expression geringer Mengen ist erforderlich zum Erhalten immunologischer Toleranz und Expression großer Mengen wird das tierische Immunsystem stören und stört die Fähigkeit, eine Immunantwort aufzubauen, die erforderlich ist für die Erzeugung monoklonaler Antikörper. Weil exakte Gewebe- oder Zelltyp-spezifische Expression nicht erforderlich ist zum Erhalten immunologischer Toleranz, werden alternativ TCR  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette cDNA-Klone inseriert in Transgen-Expressions-Kassetten (T. Choi et al., 1991, Mol. Cell. Biol., 11, 3070-3074) unter der Kontrolle von Nicht-TCR-Transkriptionssignalen. TCR  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette cDNA-Transgen-Konstrukte werden koinjiziert in Mausembryo-Pronuclei zur Bildung von transgenen Tieren. Ektopische Expression der TCR-Ketten wird nicht zur Zelloberflächen-Expression führen, da der TCR ein Multi-Kettenkomplex ist (H. Clevers et al., 1988, Ann. Rev. Immunol., 6, 629-662); jedoch ist die Zelloberflächen-Expression nicht erforderlich für die Antigen-Präsentation (Townsend et al., 1986, Nature, 324, 575-577) und die Toleranzinduktion.

25 T-Zell-Rezeptor  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette transgene Mäuse werden gezüchtet mit humanen Immunglobulin-exprimierenden transgenen Mäusen zur Bildung von Mäusen, die nützlich sind zum Erzeugen von humanen monoklonalen Antikörpern, die spezifische Untergruppen von humanen T-Zellen erkennen. Solche Mäuse werden immunisiert mit T-Zell-abgeleiteten Proteinen  
30 isoliert aus einem gesunden Spender oder einem Patienten mit einer T-Zell-Malignität, die einen einzigen TCR-Typ exprimieren. Monoklonale Antikörper-sezernierende Hybridoma



werden erzeugt und einzelne Hybridome, die humane Antikörper sezernieren, die spezifisch B-Zell-Untergruppen erkennen, werden ausgewählt.

### BEISPIEL 19

#### Genomisches schwere Kette human Ig-Transgen

Dieses Beispiel beschreibt die Klonierung eines humanen genomische schwere Kette Immunglobulin-Transgens, das sodann in die Maus-Keimbahn mittels Mikroinjektion in Zygoten oder Integration in ES-Zellen eingeführt wird.

Kerne werden isoliert aus frischem humanem Plazentagewebe gemäß Marzluff W.F. et al., 1985, *Transcription and Translation: A Practical Approach*, B.D. Hammes und S.J. Higgins, Herausgeber, Seiten 89-129, IRL Press, Oxford). Die isolierten Kerne (oder PBS-gewaschene humane Spermien) werden eingebettet in 0,5% niedrig schmelzende Agaroseblöcke und bei 50°C über 18 Stunden lysiert mit 1 mg/ml Proteinase K in 500 mM EDTA, 1% SDS für Kerne, oder mit 1 mg/ml Proteinase K in 500 mM EDTA, 1% SDS, 10 mM DTT für Spermien. Die Proteinase K wird inaktiviert durch Inkubieren der Blöcke in 40 µg/ml PMSF in TE während 30 Minuten bei 50°C und nachfolgendem gründlichen Waschen mit TE. Sodann wird die DNA in der Agarose mit dem Restriktionsenzym NotI gemäß M. Finney in *Current Protocols in Molecular Biology* (F. Ausubel et al., Herausgeber John Wiley & Sons, Supp. 4, 1988, z.B. Abschnitt 2.5.1) verdaut.

Die NotI-verdaute DNA wird dann fraktioniert durch Wechselfeldgelelektrophorese gemäß Anand, R. et al., 1989, *Nuc. Acids. Res.*, 17, 3425-3433). NotI-Fragment-angereicherte Fraktionen wurden untersucht durch Southern-Hybridisierung zum Nachweis einer oder mehrerer Sequenzen, die von diesem Fragment codiert werden. Solche Sequenzen umfassen die schwere Kette D-Segmente, J-Segmente und  $\gamma 1$ -konstante Region zusammen mit Vertretern aller 6  $V_H$ -Familien (obwohl dieses Fragment als 670 kb Fragment aus HeLa-Zellen identifiziert worden ist von Berman et al., 1988, *supra*, fanden wir es als 830 kb Fragment aus humaner Plazenta- und Spermien-DNA). Die Fraktionen mit diesem NotI-Fragment (vgl. Fig. 4) werden ligiert in die NotI-Klonierungsstelle des Vektors pYACNN gemäß McCormick, M.

et al., 1990, Technique 2, 65-71. Plasmid pYACNN wird hergestellt durch Verdau von pYACneo (Clontech) mit EcoRI und Ligation in Gegenwart des Oligonucleotids 5' - AAT TGC GGC CGC - 3'.

- 5 YAC-Klone mit dem schwere Kette NotI-Fragment werden isoliert gemäß Traver et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 5898-5902. Das klonierte NotI-Insert wird isoliert hochmolekularer Hefe-DNA durch Wechselfeldgelelektrophorese gemäß M. Finney, *supra*. Die DNA wird kondensiert durch Zusatz von 1 mM Spermin und mikroinjiziert direkt in den Kern von einzelligen Embryos wie vorstehend beschrieben. Alternativ wird die DNA isoliert durch
- 10 Wechselfeldgelelektrophorese und eingeführt in ES-Zellen durch Lipofektion (Gnirke et al., 1991, EMBO J., 10, 1629-1634) oder der YAC wird eingeführt in ES-Zellen durch Sphäroplasten-Fusion.

#### BEISPIEL 20

15

##### Diskontinuierliches genomische schwere Kette Ig-Transgen

- Ein 85 kb SpeI-Fragment humaner genomischer DNA mit V<sub>H</sub>6-, D-Segmenten, J-Segmenten, der  $\mu$ -konstanten Region und einem Teil der  $\gamma$ -konstanten Region (vgl. Fig. 4) ist isoliert
- 20 worden durch YAC-Klonierung im wesentlichen wie beschrieben in Beispiel 1. Ein YAC mit einem Fragment aus der Keimbahn-variable Region, wie ein 570 kb NotI-Fragment stromaufwärts von dem vorstehend beschriebenen 670 bis 830 kb NotI-Fragment mit mehrfachen Kopien von V<sub>1</sub> bis V<sub>5</sub> wird isoliert gemäß Berman et al. (Berman et al., 1988, *supra*, wies zwei 570 kb NotI-Fragmente nach, die jeweils mehrfache V-Segmente enthalten). Die beiden
- 25 Fragmente werden koinjiziert in den Kern eines einzelligen Mausembryos wie beschrieben in Beispiel 1.

- Typischerweise führt die Koinjektion von zwei unterschiedlichen DNA-Fragmente zur Integration beider Fragmente in die gleiche Insertionsstelle im Chromosom. Deshalb werden
- 30 ungefähr 50% der resultierenden transgenen Tiere, die mindestens eine Kopie jedes der beiden Fragmente enthalten, das V-Segment Fragment stromaufwärts von dem konstante Region enthaltenden Fragment inseriert haben. Von diesen Tieren werden etwa 50% das V mit DJ-

Verbinden durch DNA-Inversion durchführen und etwa 50% durch Deletion abhängig von der Orientierung des 570 kb NotI-Fragments relativ zur Position des 85 kb SpeI-Fragments. DNA wird isoliert aus den resultierenden transgenen Tieren und diejenigen Tiere, bei denen durch Southern-Blot-Hybridisierung gefunden wurde, daß sie beide Transgene enthalten (besonders diejenigen Tiere mit sowohl mehrfachen humanen V-Segmenten als auch humanen konstante Region Genen), werden gemäß Standardverfahren getestet auf ihre Fähigkeit zur Expression von humanen Immunglobulin-Molekülen.

### BEISPIEL 21

#### Verbinden überlappender YAC-Fragmente

Zwei YACs mit einer überlappenden Region werden in Hefe durch meiotische Rekombination verbunden gemäß Silverman et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 9913-9917, zum Herstellen eines einzelnen, großen YAC mit Sequenzen aus beiden kleineren YACs. Die beiden YACs werden aneinandergereiht (aligned) unter Berücksichtigung der Arme, so daß der verbundene YAC einen centromeren Vektorarm und einen nicht-centromeren Vektorarm enthält. Wenn notwendig, wird das Insert rekloniert in den Vektor mit einzigen Restriktionsstellen an den Enden des Inserts. Wenn das Insert nicht ein einziges Restriktionsfragment ist, werden einzelne Stellen inseriert in die Vektorarme durch Oligonucleotid-Transformation von Hefe gemäß Guthrie und Fink, *supra*, zum Verbinden von YACs mit nicht-benachbarten Sequenzen, die nicht überlappen, wird eine Überlappung folgendermaßen erzeugt. Die 3'-terminale Region des 5'-YAC und die 5'-terminale Region des 3'-YAC werden subkloniert, *in vitro* verbunden zum Erzeugen eines Verbindungsfragments und wiedereingeführt in einen oder beide YACs durch homologe Rekombination (Guthrie und Fin, *supra*). Die beiden YACs werden sodann meiotisch rekombiniert gemäß Silverman et al., *supra*. Der verbundene YAC wird eingeführt in Mäuse, z.B. wie in Beispiel 1.



## BEISPIEL 22

### Genomisches $\kappa$ -leichte Kette human Ig-Transgen

- 5 Eine Karte der humanen  $\kappa$ -leichte Kette ist beschrieben worden von Lorenz, W. et al., 1987, Nucl. Acid. Res. 15, 9667-9677 und ist in Fig. 11 gezeigt. Ein 450 kb XhoI bis NotI-Fragment, das umfaßt alle C $\kappa$ , den 3'-Enhancer, alle J-Segmente und mindestens 5 unterschiedliche V-Segmente (a) oder ein 750 kb MluI- bis NotI-Fragment, das umfaßt alle vorstehenden und zusätzlich mindestens 20 weitere V-Segmente (b), wird isoliert und wie in Beispiel 1  
10 beschrieben in Zygoten oder ES-Zellen eingeführt.

## BEISPIEL 23

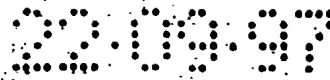
### Genomisches $\kappa$ -leichte Kette Human-Ig-Transgen gebildet durch *in vivo* homologe Rekombination

- 15 Das 750 kb MluI- bis NotI-Fragment wird verdaut mit BssHII zum Herstellen eines Fragments von etwa 400 kb (c). Das 450 kb XhoI- bis NotI-Fragment (a) zusätzlich zu dem ungefähr 400 kb MluI bis BssHII-Fragment (c) haben Sequenzüberlappung definiert durch die  
20 BssHII und XhoI-Restriktionsstellen dargestellt in Fig. 11. Homologe Rekombination dieser beiden Fragmente nach Mikroinjektion in eine Mauszygote führt zu einem Transgen mit mindestens 15 bis 20 weiteren V-Segmenten gegenüber den im 450 kb XhoI/NotI-Fragment gefundenen (Beispiel 22).

## BEISPIEL 24

### Identifizierung von funktionell rearrangierten variable Region Sequenzen in transgenen B-Zellen

- 30 Ein interessierendes Antigen wird verwendet zum Immunisieren (vgl. Harlow und Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1988) einer Maus mit den folgenden genetischen Eigenschaften: homozygot am endogenen schwere Kette-Locus für



eine Deletion von  $J_H$  (Beispiele 9 und 12); hemizygot für eine einzelne Kopie von nicht-rearrangiertem humanen schwere Kette-Mini-Locus-Transgen (Beispiele 5 und 14) und hemizygot für eine einzelne Kopie eines rearrangierten humanen  $\kappa$ -leichte Kette-Transgens (Beispiele 7 und 16).

Dem Immunisierungsschema folgend wird die Milz entfernt und Milzzellen werden verwendet zum Erzeugen von Hybridoma. Zellen eines einzelnen Hybridoma-Klons, der Antikörper sezerniert, die mit dem interessierenden Antigen reagieren, werden verwendet zum Herstellen genomischer DNA. Eine Probe genomischer DNA wird verdaut mit mehreren unterschiedlichen Restriktionsenzymen, die einzigartige 6 Basenpaar-Sequenzen erkennen, und aufgetrennt auf einem Agarosegel. Southern-Blot-Hybridisierung wird verwendet zum Hybridisieren von zwei DNA-Fragmenten im 2-10 kb Bereich, eines davon enthält die einzelne Kopie der rearrangierten humanen schwere Kette VDJ-Sequenzen und eines enthält die einzelne Kopie der rearrangierten humanen leichte Kette VJ-Sequenz. Diese beiden Fragmente werden nach Größe getrennt im Agarosegel und direkt in pUC18 kloniert. Die klonierten Inserts werden dann subkloniert in schwere bzw. leichte Kette-Expressions-Kassetten, die konstante Region-Sequenzen enthalten.

Der Plasmid-Klon p $\gamma$ el (Beispiel 14) wird verwendet als eine schwere Kette-Expressions-Kassette und rearrangierte VDJ-Sequenzen werden kloniert in die XhoI-Stelle. Der Plasmid-Klon pCK1 wird verwendet als eine leichte Kette-Expressions-Kassette und rearrangierte VJ-Sequenzen werden kloniert in die XhoI-Stelle. Die resultierenden Klone werden zusammen verwendet zum Transfizieren von SP $\phi$ -Zellen zum Herstellen von Antikörpern, die mit dem interessierenden Antigen reagieren (M.S. Co. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2869).

Alternativ wird mRNA isoliert aus klonierten Hybridoma-Zellen wie vorstehend beschrieben und verwendet zur Synthese von cDNA. Die exprimierte humane schwere und leichte Kette VDJ- und VJ-Sequenz wird dann amplifiziert durch PCR und kloniert (J.W. Larrich et al., 1989, Biol. Technology, 7, 934-938). Nachdem die Nucleotidsequenz dieser Klone bestimmt worden ist, werden Oligonucleotide synthetisiert, die die gleichen Polypeptide codieren und

synthetische Expressionsvektoren werden erzeugt gemäß C. Queen et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 5454-5458.

22.09.97

EP 91 916 470.7-2105  
GENPHARM INTERNATIONAL, INC.  
U.Z. 29-120

5

## PATENTANSPRÜCHE

10

1. Ein Immunglobulin (Ig)-schwere Kette-Minilocus-Transgen-Konstrukt umfassend DNA-Sequenzen, die humane variable (V), diversity [Vielfalt] (D), joining [verbindende] (J) und konstante Regionen eines humanen Ig Proteins kodieren, wobei diese Sequenzen in operativer Weise mit Transkriptions-regulatorischen Sequenzen verbunden und fähig zum in-vivo Gen-Rearrangement [Genumlagerung] sind, wenn sie in einem non-humanen transgenen Tier integriert sind, sodaß ein rearrangiertes Gen gebildet wird, das ein humanes schwere Kette-Polypeptid kodiert, wobei dieses Konstrukt auch eine  $\mu$ -Klassenwechsel-Donor-Region 5' von einer  $\mu$  konstanten Region und eine humane gamma-Klassenwechsel-Akzeptorregion zwischen der  $\mu$  konstanten Region und einer humanen gamma konstanten Region umfaßt, wobei diese Klassenwechsel-Sequenzen in operativer Weise verbunden sind zur Durchführung des Klassenwechsels *in vivo* und zur Herstellung des humanen gamma-schwere Kette-Polypeptids.

20

25

2. Verwendung eines Konstrukts nach Anspruch 1 zum Herstellen eines transgenen non-humanen Tiers, welches fähig ist, ein humanes gamma-schwere Kette-Polypeptid als Antwort auf Kontakt mit Antigen herzustellen.

30

3. Verfahren zur Herstellung eines transgenen non-humanen Tiers, welches fähig ist, ein humanes gamma-schwere Kette-Polypeptid herzustellen als Antwort auf Kontakt mit Antigen, wobei das Verfahren das funktionelle Zerstören des endogenen Immunglobulin-schwere Kette-Locus umfaßt und das Einbauen eines Transgen-Konstrukts nach Anspruch 1 in das tierische Genom.

4. Verwendung eines Tiers erhältlich durch ein Verfahren nach Anspruch 3 zur Herstellung von B-Zellen, die gamma-Immunglobulin produzieren, wobei das Immunglobulin eine humane schwere Kette hat und an ein ausgewähltes Antigen bindet.
5. Verfahren zur Herstellung von B-Zellen, die an ein ausgewähltes Antigen bindendes gamma-Immunglobulin mit einer humanen schweren Kette herstellen, umfassend in Kontakt bringen eines Tiers erhältlich durch ein Verfahren nach Anspruch 3 mit dem Antigen und Screening auf B-Zellen aus dem Tier, die das Antigen binden.
6. B-Zellen erhältlich durch ein Verfahren nach Anspruch 5.
7. Hybridom erhältlich durch Immortalisieren von B-Zellen nach Anspruch 6.
8. Hybridom erhältlich durch Fusionieren einer B-Zelle nach Anspruch 6 mit einer Myelom-Zelle.
9. Verwendung von B-Zellen nach Anspruch 6 zum Herstellen eines Hybridoms oder des entsprechenden monoklonalen Antikörpers.
10. Verfahren zum Herstellen eines monoklonalen Antikörpers umfassend das Kultivieren eines Hybridoms nach Anspruch 7 oder 8.
11. Verfahren zur Herstellung eines an ein ausgewähltes Antigen bindendes gamma-Immunglobulins mit humaner schwerer Kette, umfassend das in Kontakt bringen eines Tiers erhältlich durch ein Verfahren nach Anspruch 3 mit dem Antigen und das Erhalten des gamma-Immunglobulins aus dem Tier.



2009.97

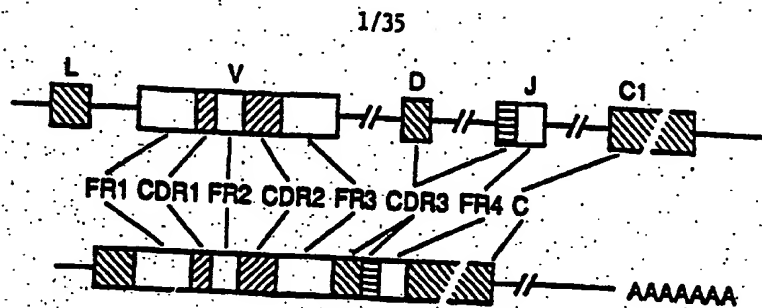


FIG. 1

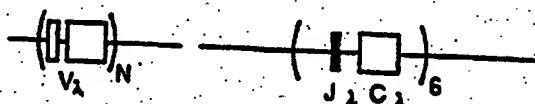


FIG. 2

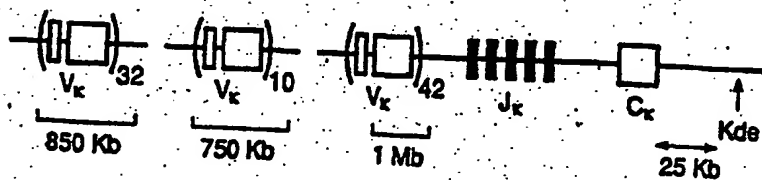


FIG. 3

**KONSTANTE REGION**  
(~300 Kb)

**V REGION**  
(~2000 Kb)



200 Kb

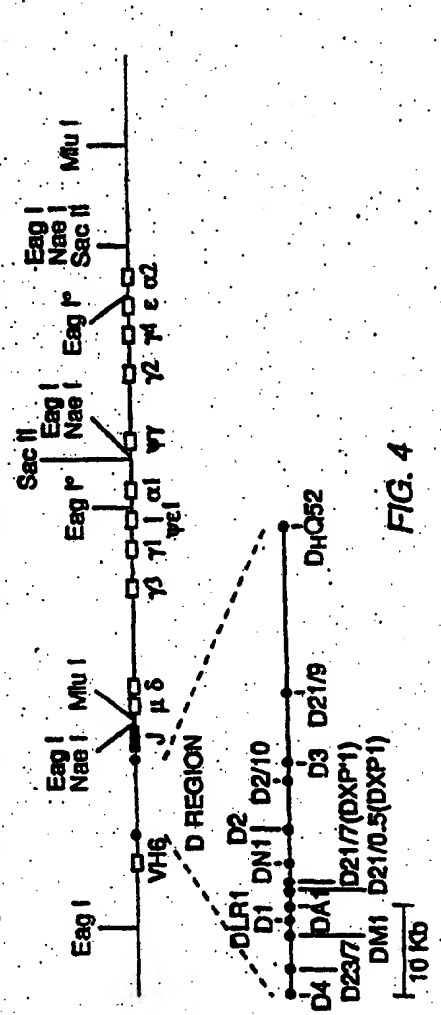
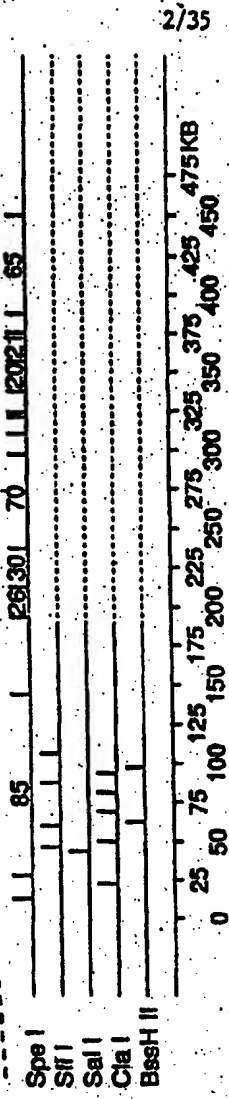


FIG. 4

220097

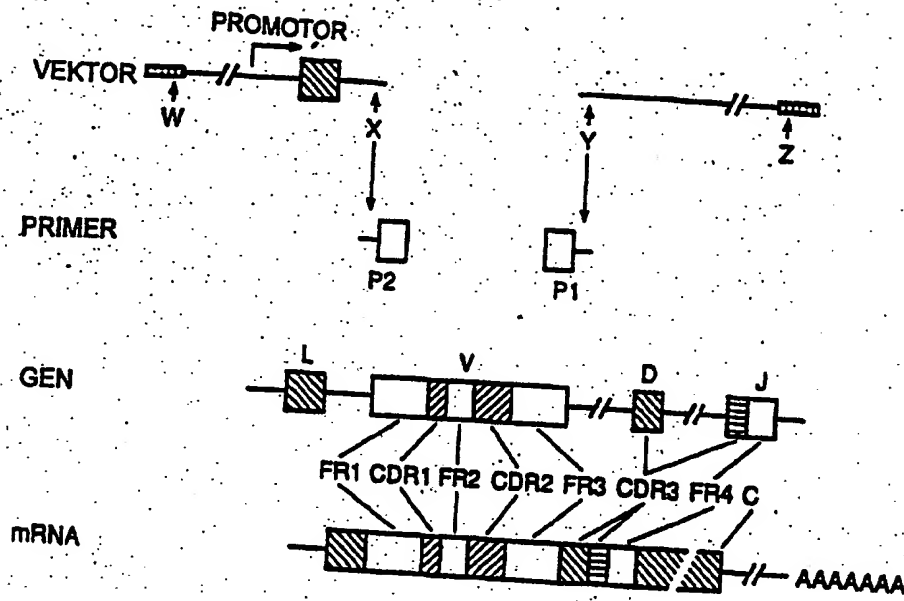


FIG. 5

22.09.97

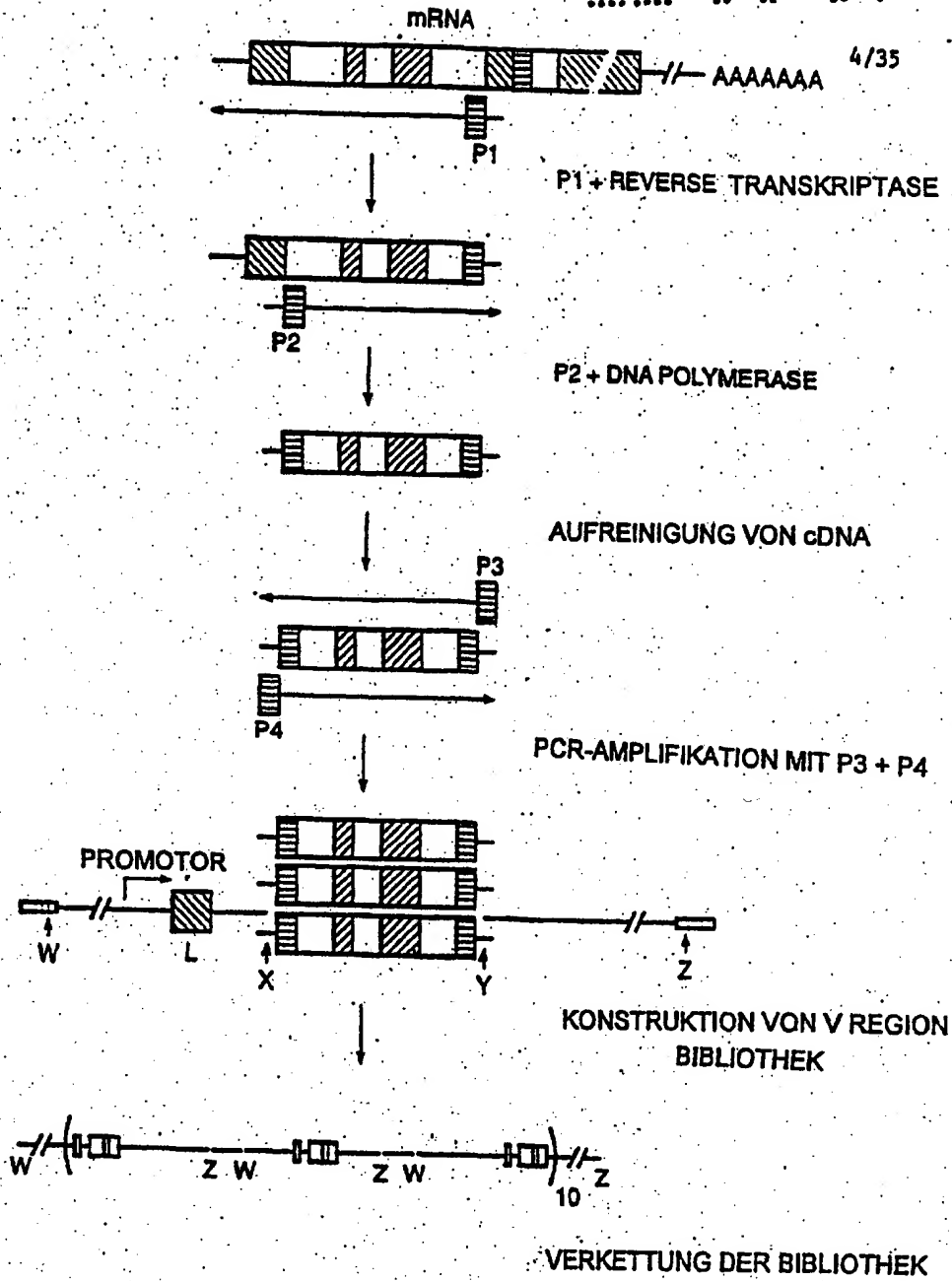


FIG. 6

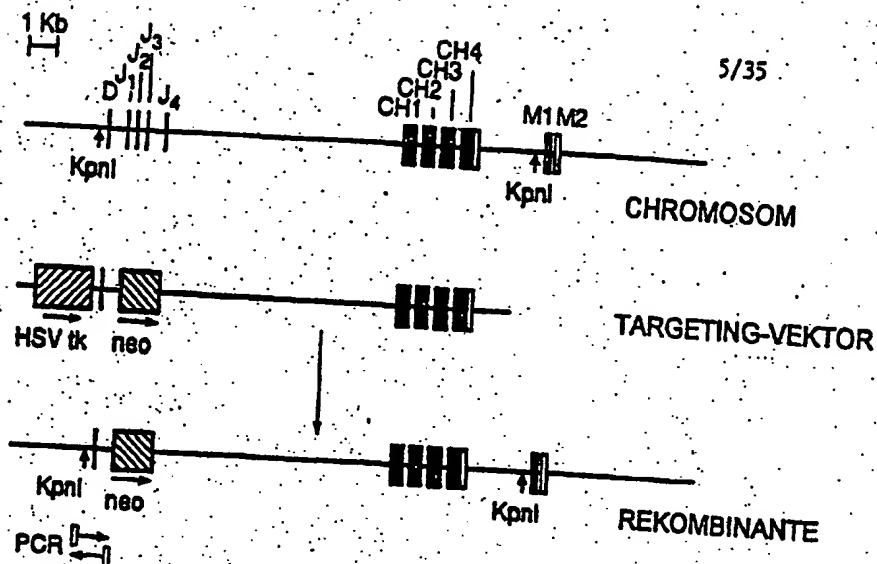


FIG. 7

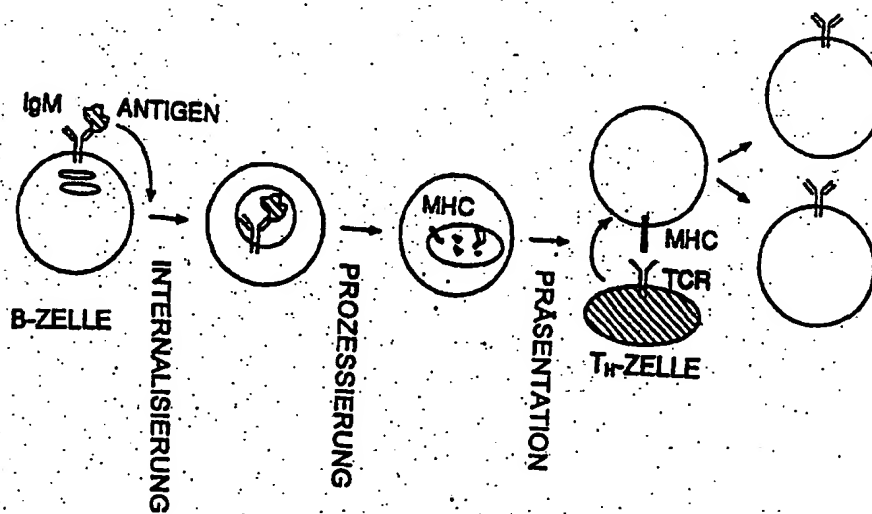


FIG. 8

22.09.97

6/35

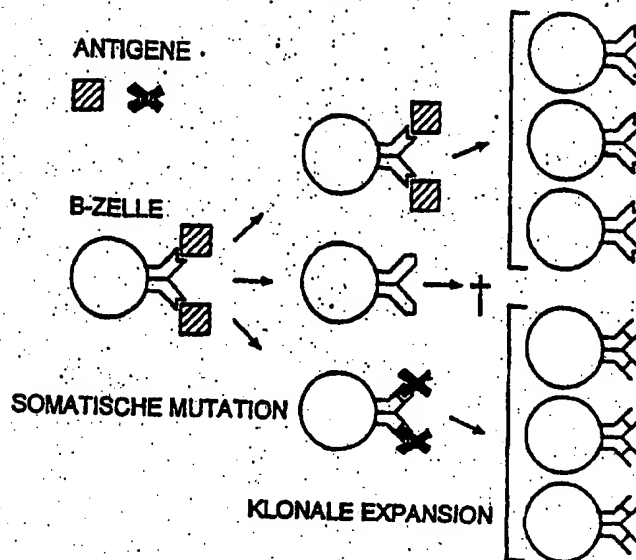


FIG. 9

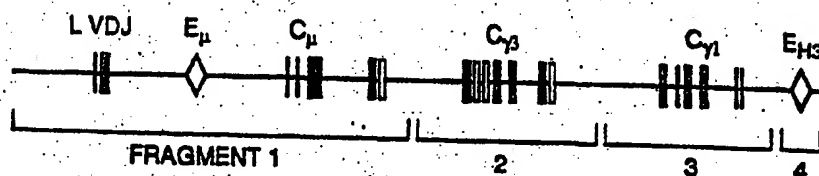


FIG. 10

22.09.97

7/35

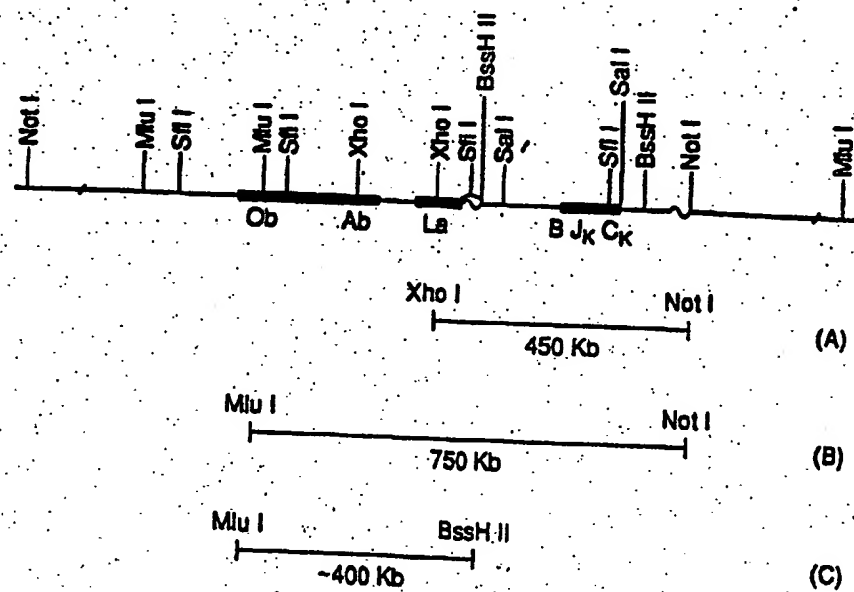


FIG. 11

22.09.97

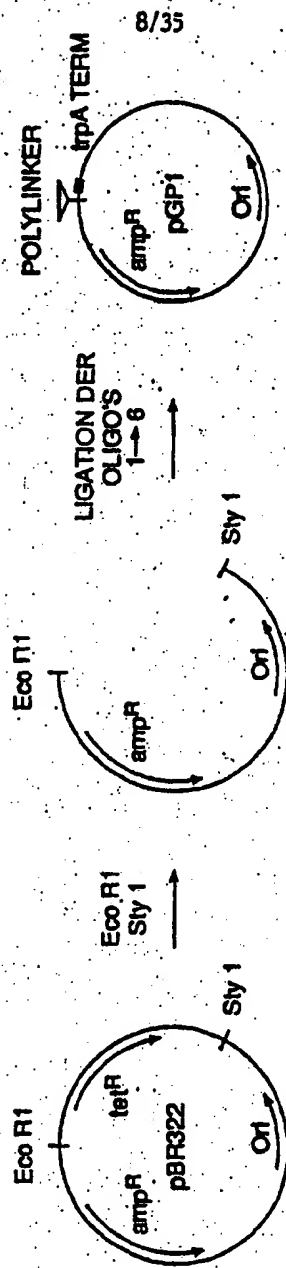


FIG. 12

8/35



2007

9/35

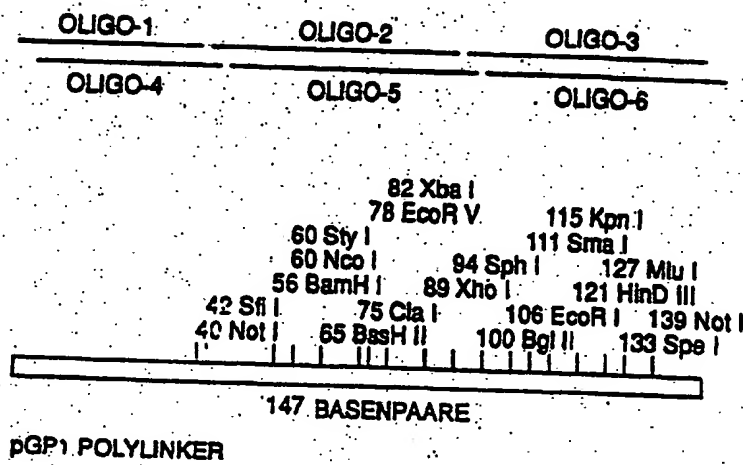
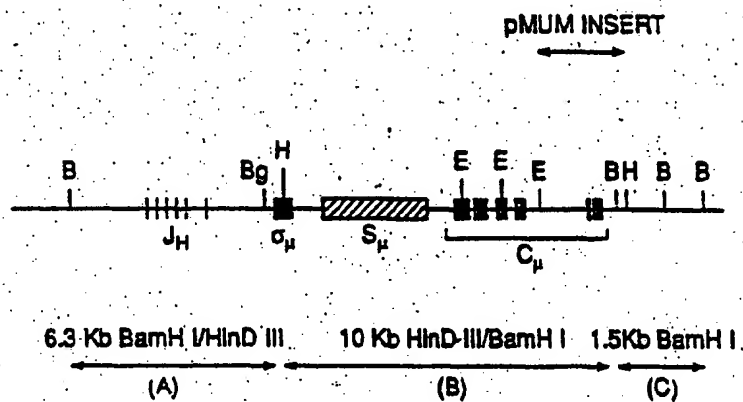


FIG. 13

22.09.97

10/35



HUMAN  $\mu$  LOCUS

FIG. 14

11/35

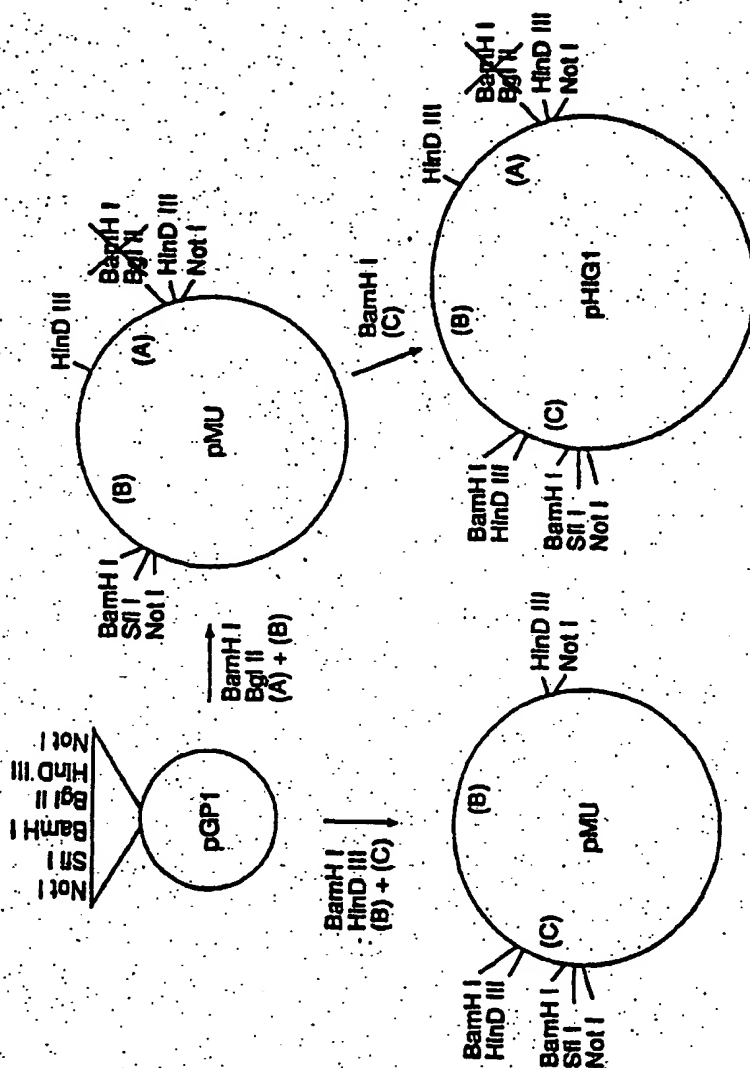


FIG. 15

200907

12/35

# HUMAN C<sub>γ</sub>1 GEN

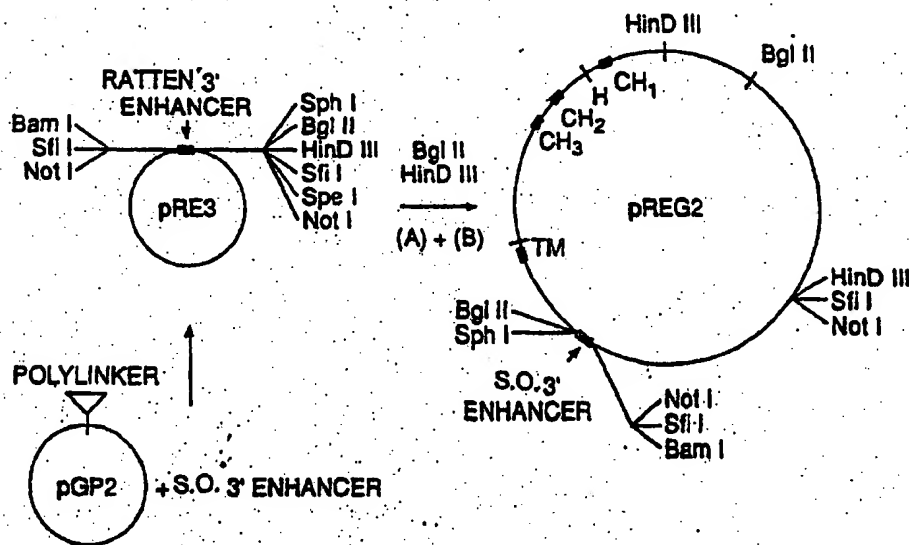
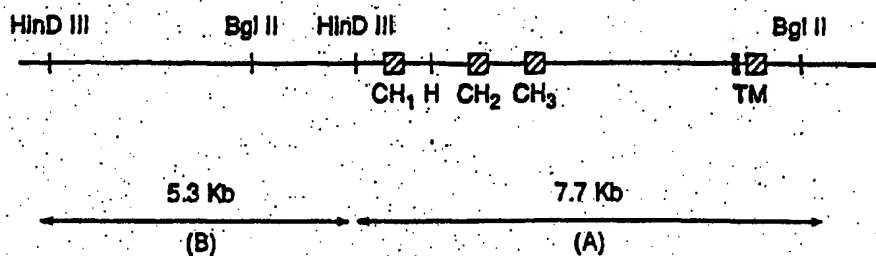


FIG. 16

22 09 97

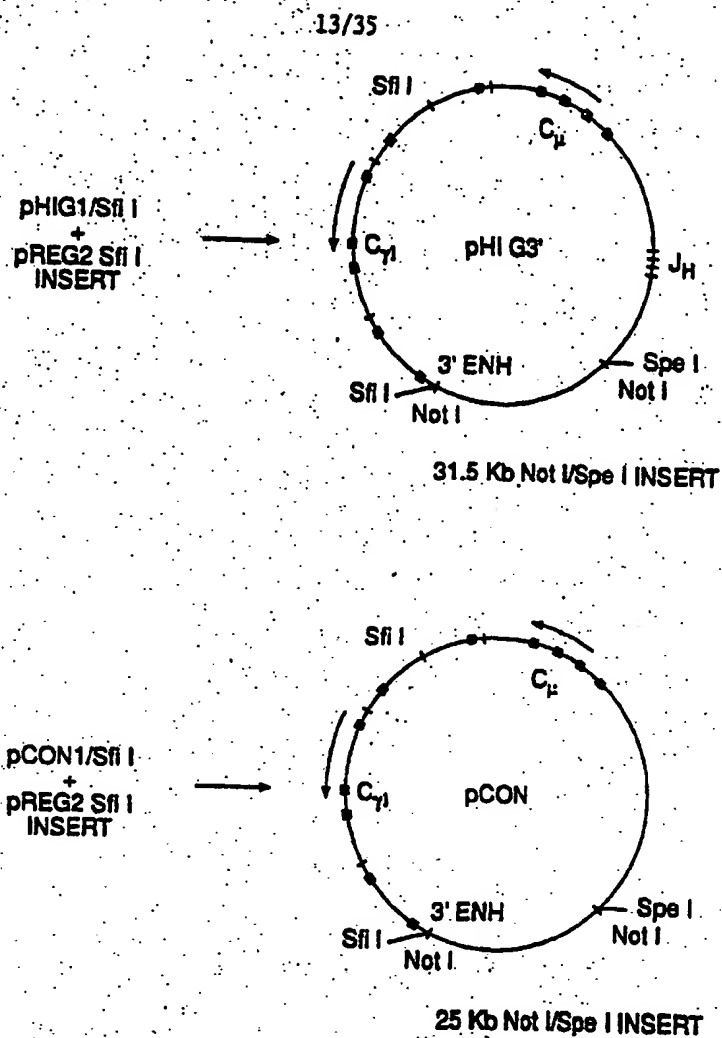


FIG. 17

200997

HUMAN D REGION

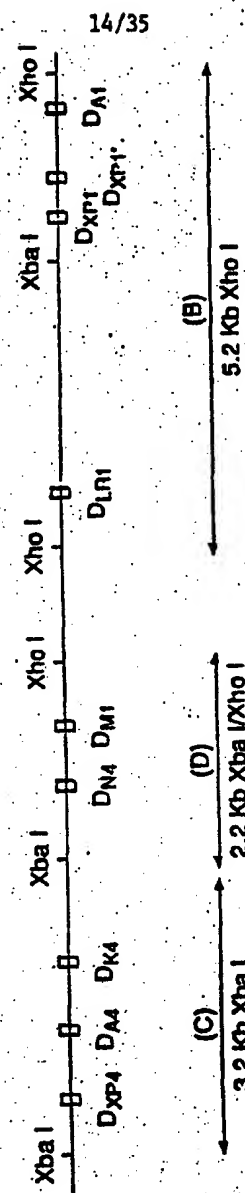


FIG. 18

20997

15/35

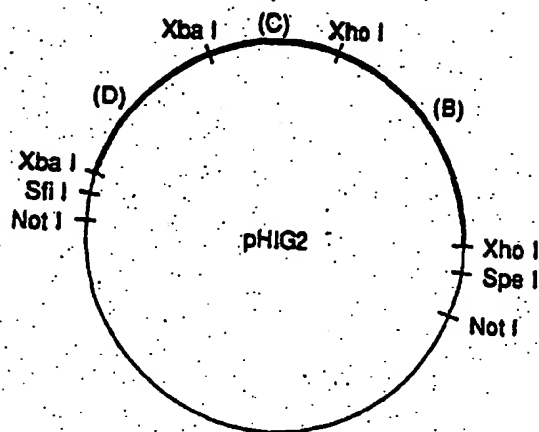


FIG. 19

22.09.97

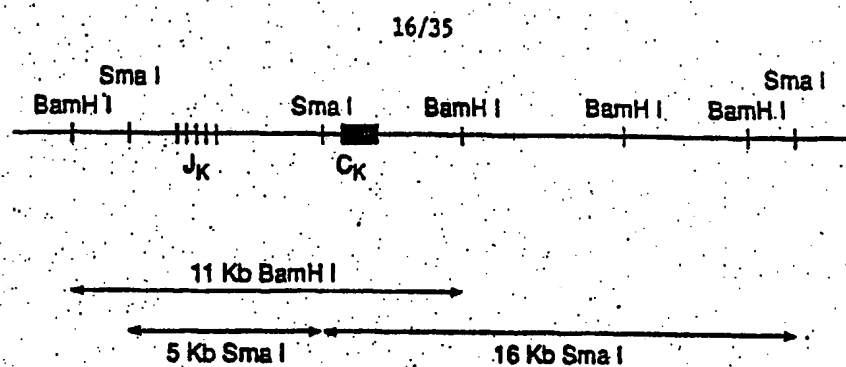


FIG. 20

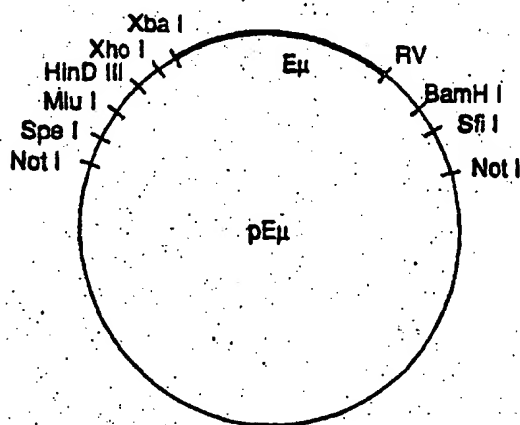


FIG. 21





17/35

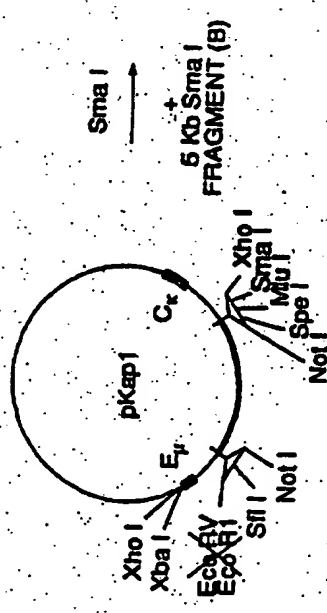
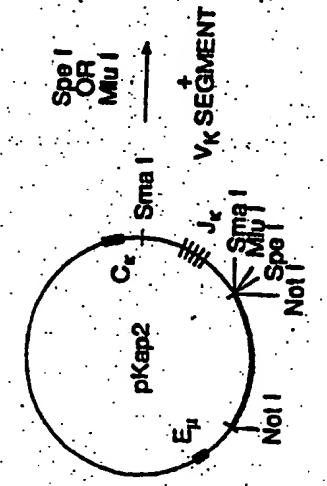
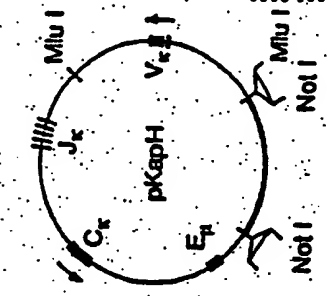


FIG. 22

22.09.87

18/35

MAUS-SCHWERE KETTE-LOCUS

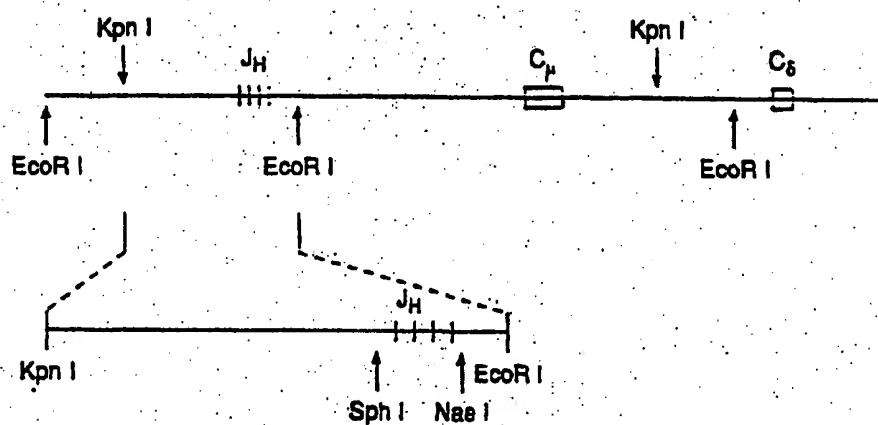


FIG. 23a

20097

19/35

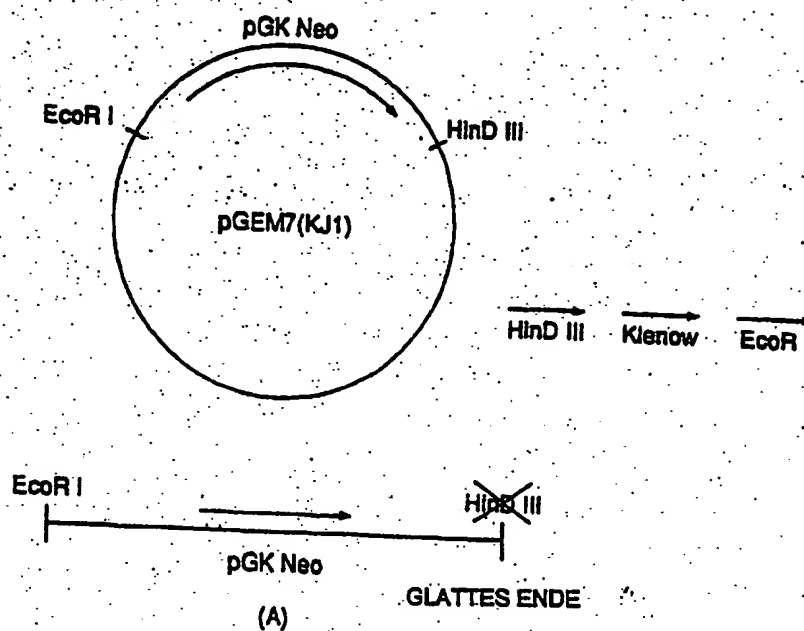


FIG. 23b

2009

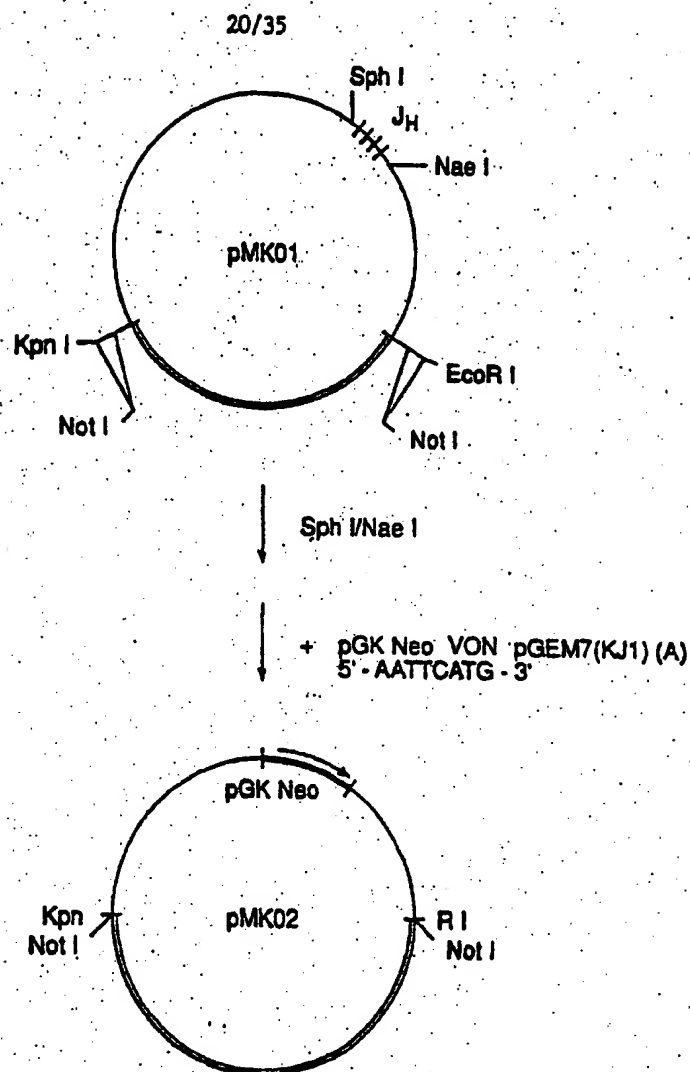


FIG. 23c

220907

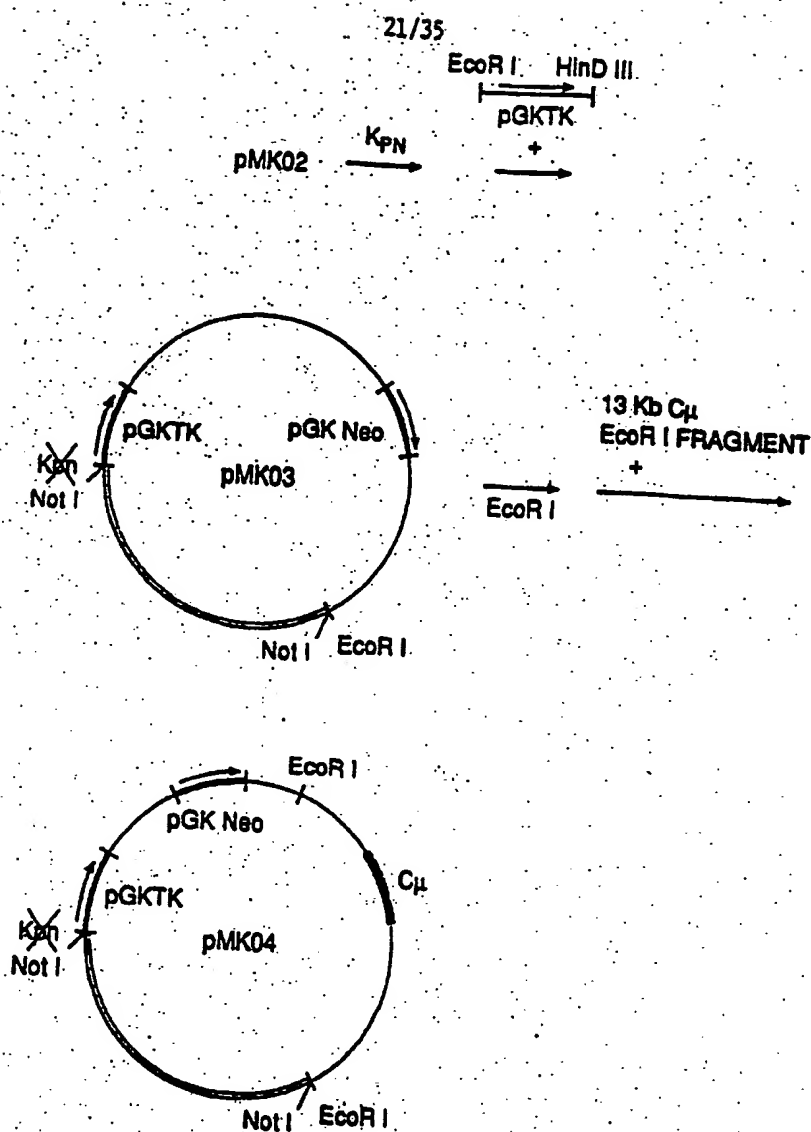


FIG. 23d

22.09.97

22/35

MAUS KAPPA GEN

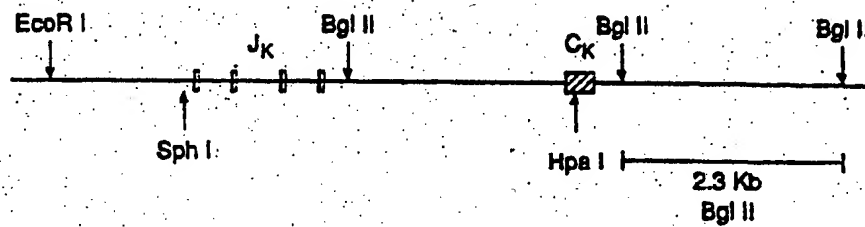


FIG. 24a

2009-07

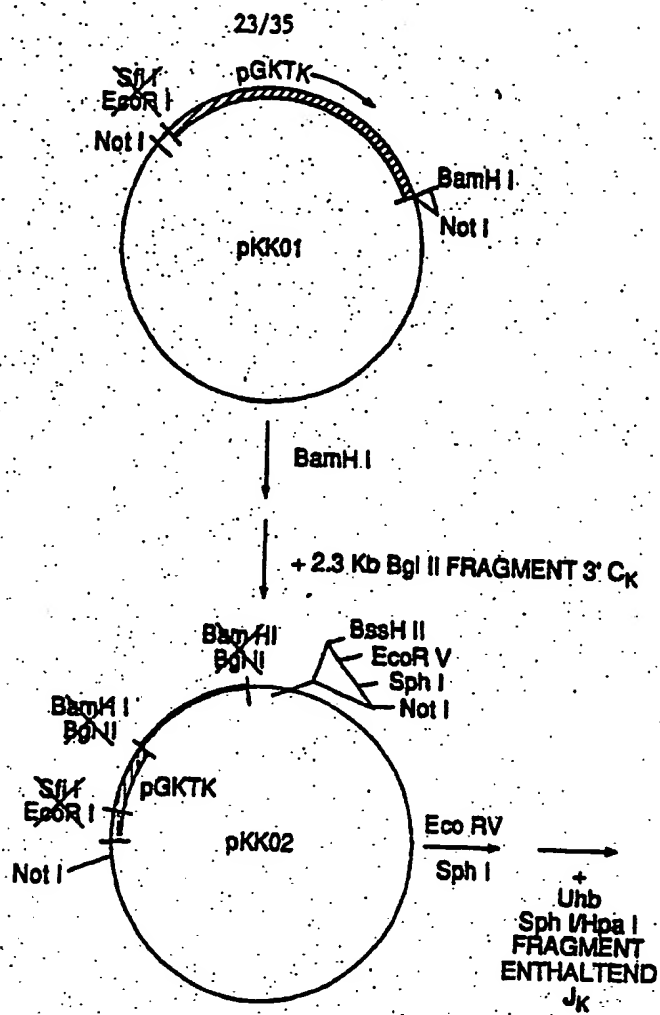


FIG. 24b

220997

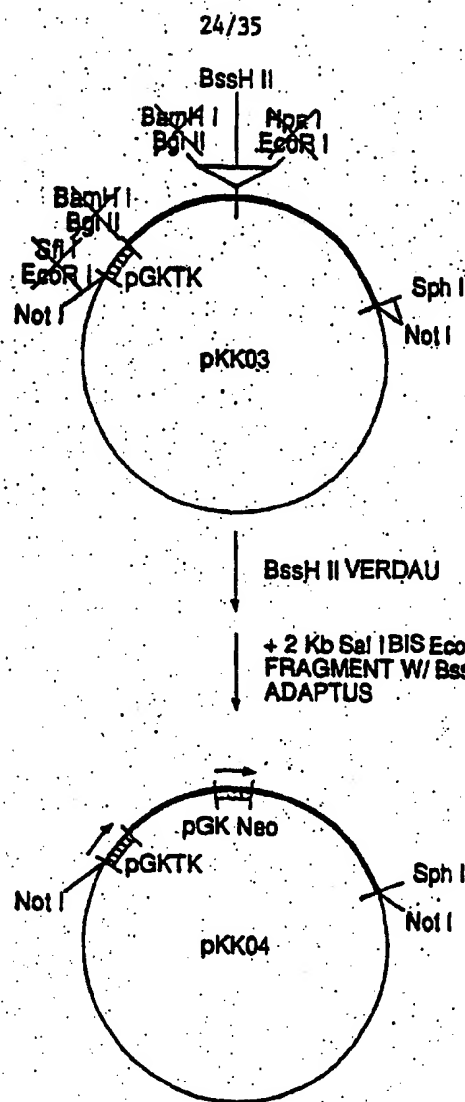


FIG. 24c





20.09.97

26/35

MAUS-SCHWERE KETTE-TARGETING-VEKTOR

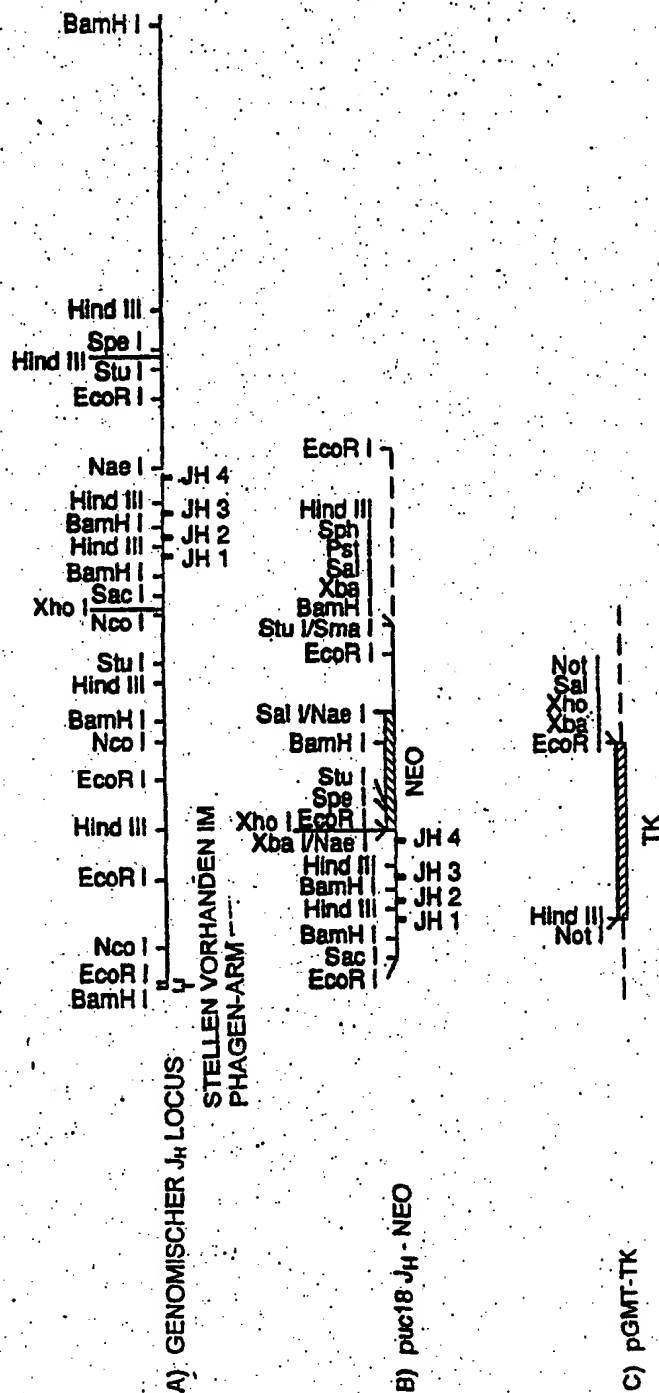


FIG. 26a

27/35

MAUS-SCHWERE KETTE-TARGETING-VEKTOR

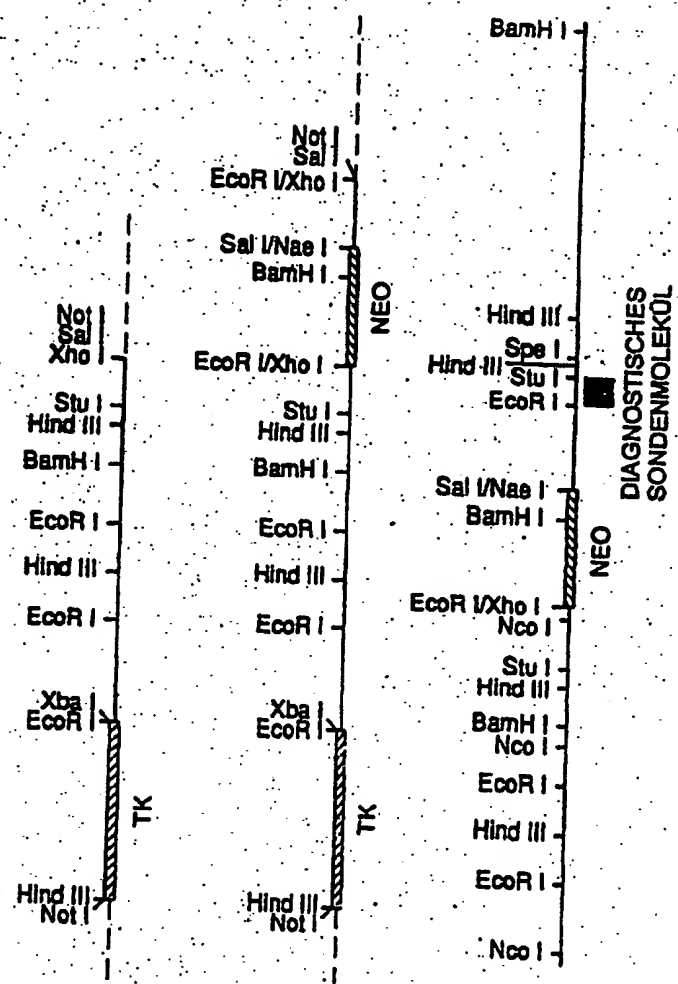


FIG. 26b

D) pGMT-TK-JH5

E) JHk01

F) TARGETED JH LOCUS

20097

28/35

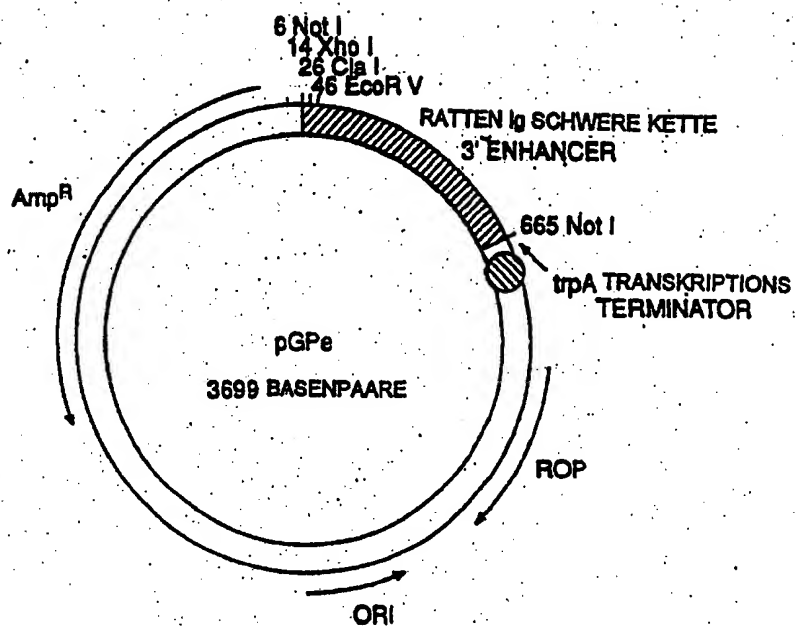


FIG. 27

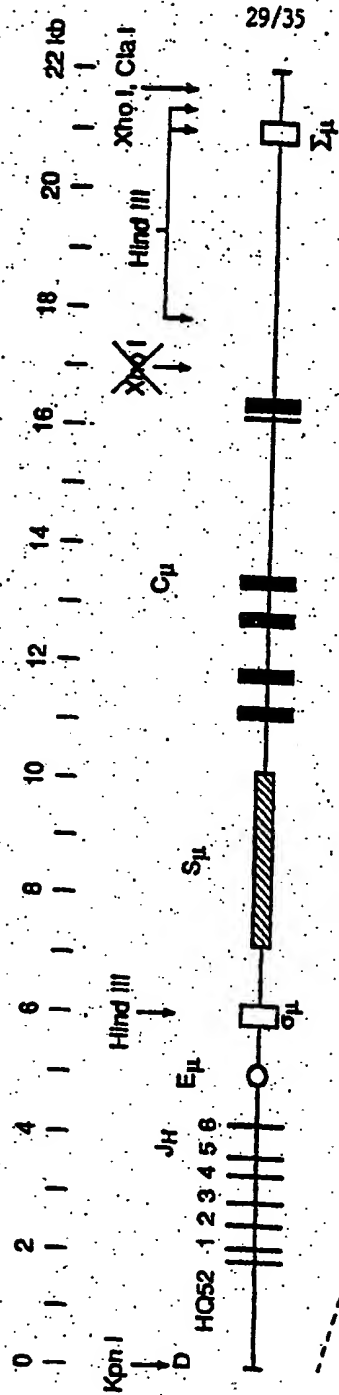


FIG. 28

20097

20.08.97

30/35

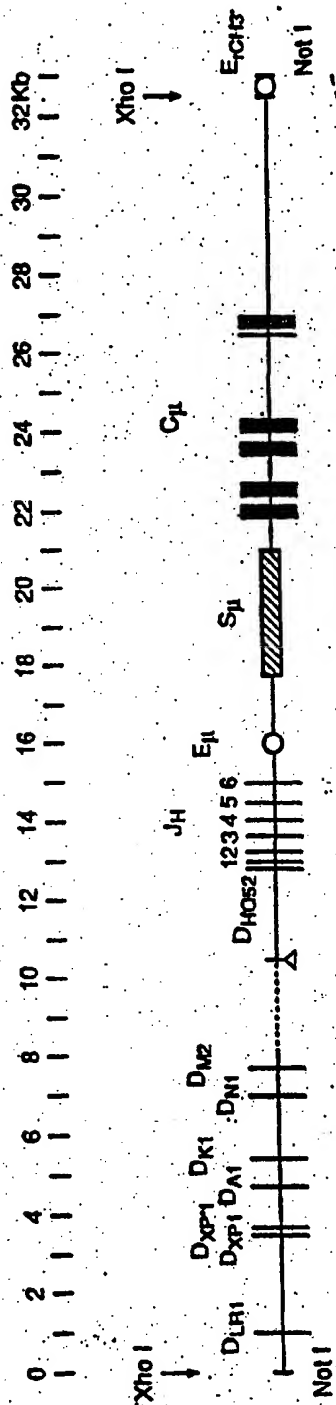


FIG. 29

2005

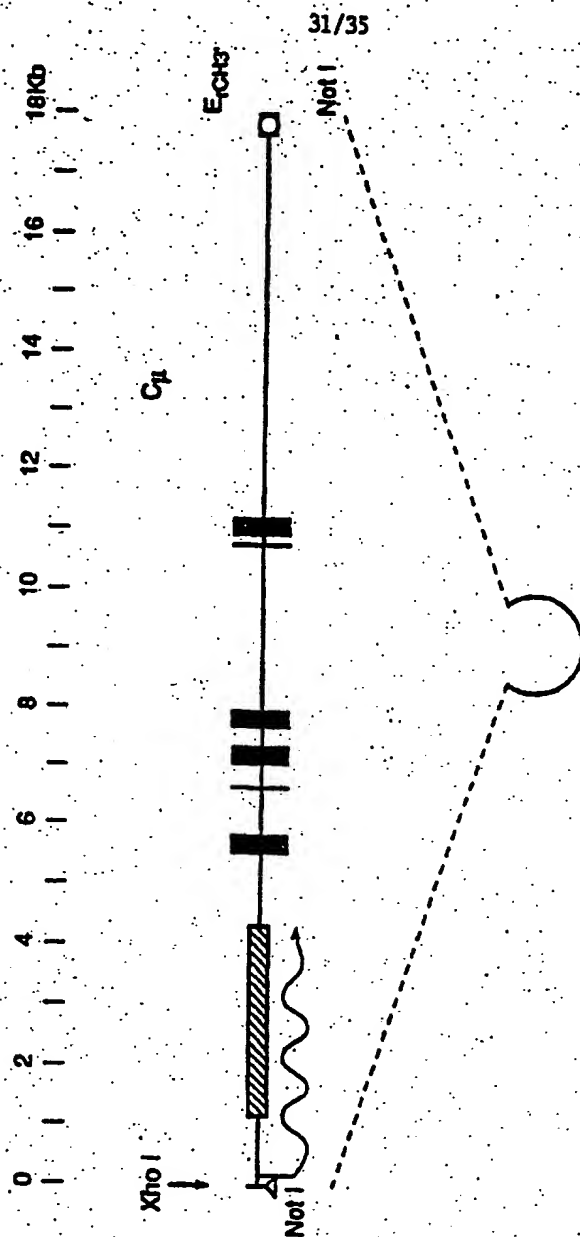


FIG. 31

2009

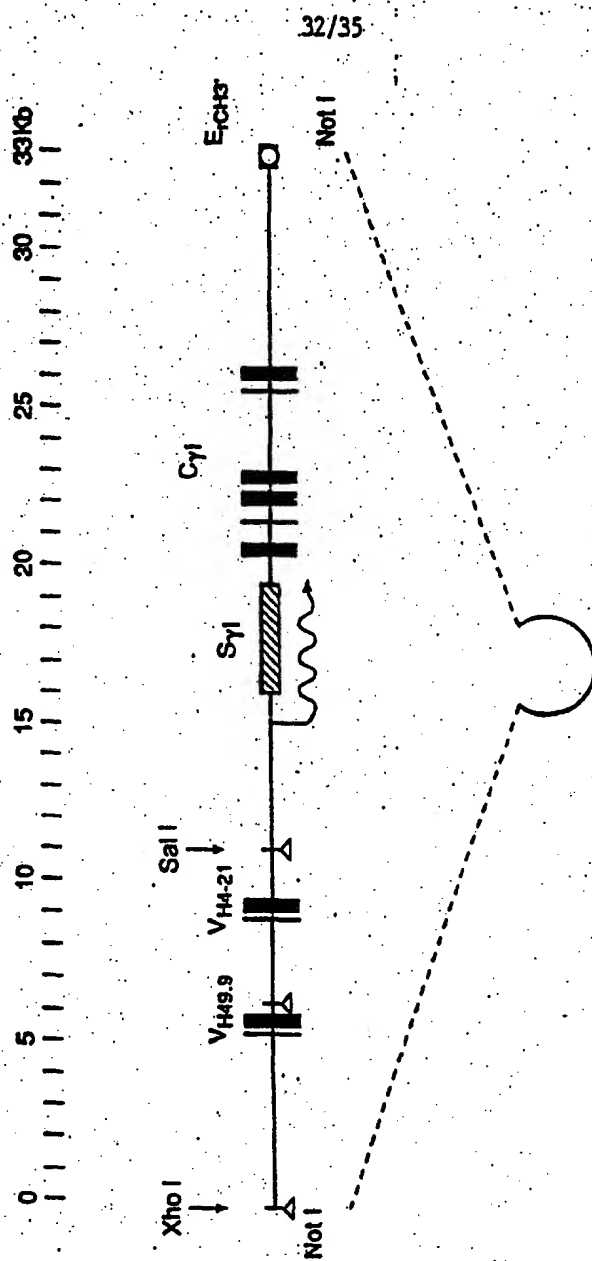
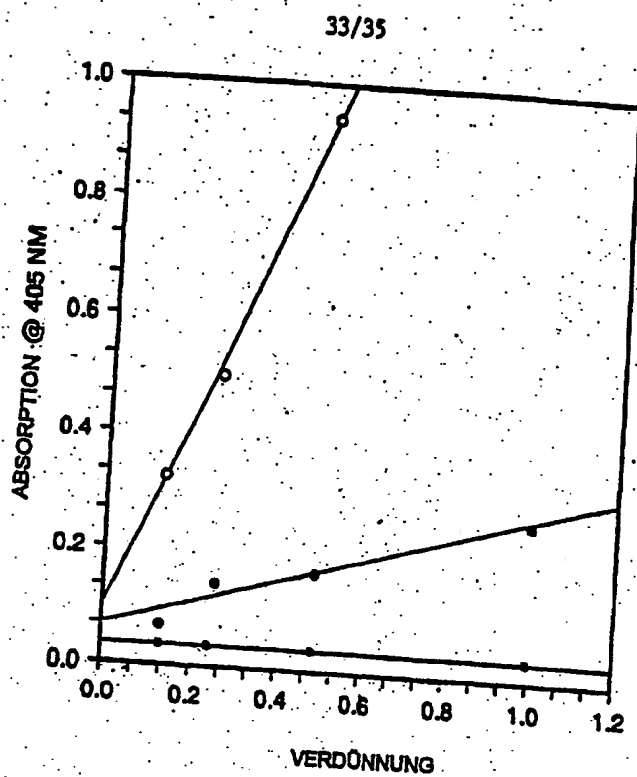


FIG. 32



22.09.97



○ IgM } PHC1 TRANSGEN  
 ● IgG1 }  
 \* IgM } NON-TRANSGEN-KONTROLLE  
 + IgG1 }

FIG. 33

22.09.97

34/35

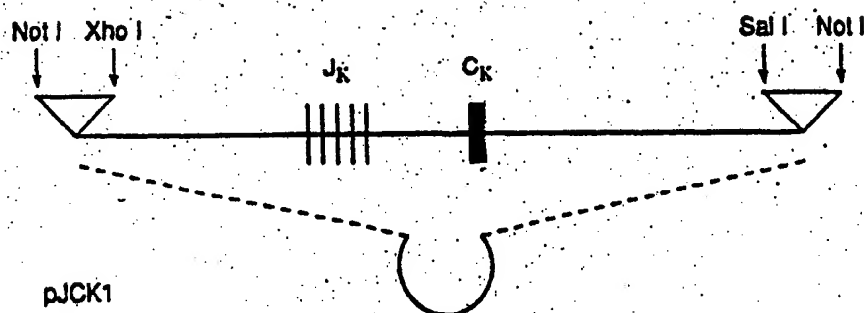


FIG. 34

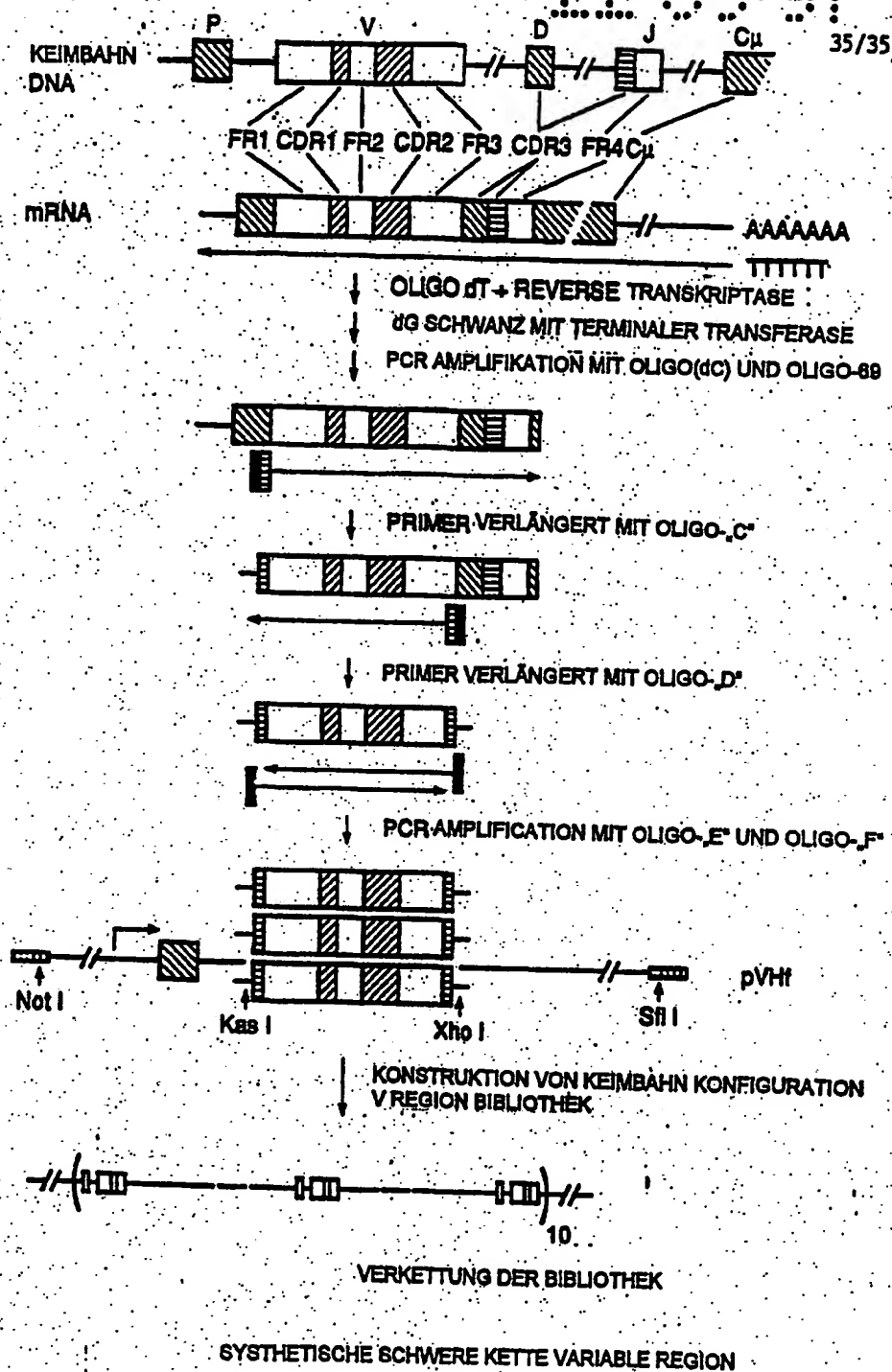


FIG. 35

